

UNIVERSITÉ DE NANCY

FACULTÉ DES SCIENCES

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE NANCY

POUR OBTENIR

le grade de Docteur de l'Université de Nancy

PAR

M. J.-DIDIER SIMON

LICENCIÉ ÈS-SCIENCES, INGÉNIEUR CHIMISTE

1^{re} THÈSE. — Contribution à l'Étude du « *Bacillus Sincyanus* »
et de son pigment.

2^e THÈSE. — Proposition donnée par la Faculté.

Soutenues le 28 Mars 1908 devant la Commission d'examen

Président : M. PETIT.

Examineurs { MM. MULLER.
MINGUIN.

NANCY

IMPRIMERIE P. PIERRON, RUE DU FOUR, 1

1908

UNIVERSITÉ DE NANCY

FACULTÉ DES SCIENCES

THÈSES

PRESENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE NANCY

POUR OBTENIR

le grade de Docteur de l'Université de Nancy

PAR

M. J.-DIDIER SIMON

LICENCIÉ ÈS-SCIENCES, INGÉNIEUR CHIMISTE

1^{re} THÈSE. — Contribution à l'Étude du « *Bacillus Sincyanus* »
et de son pigment.

2^e THÈSE. — Proposition donnée par la Faculté.

Soutenues le 28 Mars 1908 devant la Commission d'examen



Président : M. PETIT.

Examineurs { MM. MULLER.
MINGUIN.

NANCY

IMPRIMERIE P. PIERRON, RUE DU FOUR, 1

1908

Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE NANCY

FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen

M. FLOQUET, ✱, I ②.

Doyen honoraire

M. GRANDEAU, C ✱, I ②, C ③.

Professeurs honoraire

MM. GRANDEAU, C ✱, I ②, C ③; FRIANT, I ②; HALLER, C ✱, I ②.

Professeurs

MM. LE MONNIER, ✱, I ②, ③.	<i>Botanique.</i>
FLOQUET, ✱, I ②.	<i>Analyse.</i>
THOULET, ✱, I ②.	<i>Minéralogie.</i>
MOLK, I ②.	<i>Mécanique rationnelle.</i>
ARTH, ✱, I ②.	<i>Chimie industrielle.</i>
BLONDLOT, O ✱, I ②.	<i>Physique.</i>
CUÉNOT, I ②, ③.	<i>Zoologie.</i>
GUNTZ, ✱, I ②.	<i>Chimie minérale.</i>
VOGT, I ②.	<i>Mathématiques appliquées.</i>
PETIT, ✱, I ②, ③.	<i>Chimie agricole.</i>
MULLER, I ②.	<i>Chimie, physique et électro-chimie.</i>
CARTAN, I ②.	<i>Calcul différentiel et intégral.</i>
NICKLÈS, I ②.	<i>Géologie.</i>
MINGUIN, I ②.	<i>Chimie.</i>
GUTTON, A ②.	<i>Physique.</i>
BLAISE, I ②.	<i>Chimie organique.</i>

Professeurs adjoints

MM. SAINT-REMY, I ②.	<i>Zoologie.</i>
GAIN, I ②.	<i>Botanique.</i>
BOUIN, A ②.	<i>Zoologie appliquée.</i>
ROTHÉ, A ②.	<i>Physique.</i>

Maîtres de conférences

MM. MAUDUIT, A ②.	<i>Electrotechnique.</i>
WAHL, A ②.	<i>Chimie tinctoriale.</i>

Chargé d'un cours complémentaire

M. MILLOT, I ②. *Météorologie.*

Secrétaire

M. ROVEL, I ②.

A MES PARENTS

Témoignage d'affection et de reconnaissance.

A MON MAITRE

MONSIEUR P. PETIT

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY
DIRECTEUR DE L'ÉCOLE DE BRASSERIE

Hommage de profonde reconnaissance.

PREMIÈRE THÈSE

• •

CONTRIBUTION

A L'ÉTUDE DU

BACILLUS SYNCYANUS

ET DE SON PIGMENT

• •

HISTORIQUE

Le « lait bleu » est un des phénomènes les plus curieux et, en même temps, les plus déconcertants qu'il ait été donné de constater.

L'apparition soudaine de cette coloration bleue dans les pots à lait ; sa disparition aussi inexplicable pour les fermiers ; puis sa réapparition, à quelques mois ou même quelques années de là, dans les laiteries les mieux tenues, ne pouvaient que jeter un trouble profond dans l'esprit des personnes qui furent témoins du phénomène.

Il y a à peine vingt-cinq ans, les fermiers de Normandie, dont le lait donnait des marques de cette maladie, n'osaient fournir aucun renseignement à ce sujet. Ils attribuaient encore la cause de ce phénomène à des maléfices : « Un mauvais sort leur avait été jeté. »

Il a fallu un nombre d'études déjà considérable et l'intervention du microscope pour restreindre, à ses justes limites, le champ si largement ouvert à toutes les imaginations.

P. Behr (1) signale, en 1890, une race du bacille du « lait bleu » qui, depuis vingt mois, ne donne plus de matière colorante. Et, cependant, cette variété est absolument identique aux autres qui produisent le pigment bleu.

L'auteur se demande si cette perte du pouvoir chromogène n'a pas quelque analogie avec la perte de la virulence.

Gessard (2) remarque que le bacille du « lait bleu » possède deux fonctions : l'une chromogène, l'autre fluorescente, et arrive à les séparer. Il constate et explique l'utilité du glucose dans les bouillons de culture. Son étude sur la formation du pigment n'arrive pas à élucider le phénomène. Enfin il conclut que, dans le lait, la formation du pigment est due à une symbiose, car la bactérie serait incapable d'utiliser toute seule les éléments du lait pour produire la matière colorante bleue.

En 1895, le Dr K. Thümm (3) publie une étude extrêmement intéressante sur les bactéries fluorescentes, où il compare les deux races du *Bacillus Syncyanus*, et donne les moyens de les différencier.

Teisi Matzuschita (4) donne, en 1901, les températures de culture du bacille du « lait bleu ».

Enfin, en 1902, Maassen (5) a constaté que dans un bouillon contenant 0,50 % de salpêtre et 5 % de peptone, après quatre semaines de culture à 30°, on obtenait une certaine quantité de nitrite.

Cette même année, Paul Ernst (6), dans un travail général très important, étudie en passant la constitution du *Bacillus Syncyanus*.

(1) P. BEHR. — Ueber eine nicht farbstoffbildende Race des Bacillus der blauen Milch. (Cent. Blatt f. Bakt. VIII, 1890, p. 485).

(2) GESSARD. — Fonctions et races du bacille cyanogène. (Ann. de l'Inst. Pasteur, T. V., 1891, p. 737).

GESSARD. — Microbes chromogènes : Pus bleu et lait bleu. (Conf. faite à l'Inst. Pasteur, le 9 avril 1892 Revue scientifique, 1892, n° 49, p. 571).

(3) Dr K. THÜMM. — Beiträge zur biologie der fluoreszierenden Bakterien. (Arch. des bakt. Instituts der grossh. Hochschule zu Karlsruhe, 1895).

(4) TEISI MATZUSCHITA. — Der Einfluss der Temperatur und Ernährung auf die Eigenbewegung der Bakterien. (Centr. Blatt. VII, n° 7, 1901).

(5) MAASSEN. — Die zersetzung der nitrate und der nitrite durch Bakterien. (Cent. Blatt. VIII, p. 152, 1902).

(6) P. ERNST. — Ueber den Bau der Bakterien. (Central blatt. VII, p. 34, 1902).

La même année, Steinhof (1), de son côté, arrive aux mêmes conclusions. Ce sont ces deux auteurs qui ont fait faire le premier pas à cette question passionnante.

Fuchs (2), en 1841, était amené à découvrir, après de très nombreuses recherches, que le « lait bleu » était dû à une infection et qu'il en suffisait d'une trace pour reproduire le même accident dans un lait absolument sain. Il nomme *Vibrio Syanogenus* le bacille cause du phénomène.

Mais l'année suivante, Hering (3) et Wiener (4) combattent énergiquement la théorie émise par Fuchs.

Un travail des plus importants date de 1852 : Haubner (5), après de très nombreuses expériences, tira, entre autres, cette conclusion : que l'intensité de la coloration est d'autant plus grande que l'alcalinité du lait est plus faible.

Gielen (6) et Elten (7), en 1864, ne font que confirmer la théorie de Fuchs.

Mosler (8) et Hoffmann (9) identifient le ferment du lait bleu à celui de l'acide lactique et au vulgaire *Penicilium Glaucum*.

Erdmann (10) puis Schroeter (11) font des recherches sur la nature de la matière colorante du « lait bleu ». Ils estiment qu'elle offre une grande analogie avec les couleurs d'aniline

(1) STEINHOFF. — Ueber das Blauwerden der Milch. Neue Analen der Mecklenburgischen landwirthschaftlichen Gesellschaft, 1838.

(2) FUCHS. — Beiträge zur näheren Kenntniss der Gesunden und fehlerhaften Milch der Hausthiere-Gurkt und Hertwig's Magazin für die Gesamnte Thierheilkunde, Bd VII, 2^e p., 1841.

(3) HERING. — Repertorium der Thierheilkunde, Jahrgang X, 1842.

(4) WIENER. — Zeitschrift für Thierheilkunde und Viehzucht, Bd IX, 1842.

(5) HAUBNER. — Wissenschaftliche und praktische Mittheilungen. Magazin für die Gesamnte Thierheilkunde, Bd XVIII, 1852.

(6) GIELEN. — Kur der blauen Milch der Kühe. Magaz. für Ges. Thierheilkunde, Bd VII, 2^e p., 1864.

(7) ELTEN. — Centralblatt f. d. Gesamnte Landeskultur in Böhmen. Prag., 1864.

(8) MOSLER. — Ueber blaue Milch und durch deren Genuss herbeigeführte Krankheiten. (Virchow's Archiv), Bd 43, 1868.

(9) HOFFMANN. — Botanische Zeitung, 1865.

(10) ERDMANN. — Bildung von Anilinfarben aus Proteinkörpern. (Journal f. prakt. Chemie, Bd 99), 1866.

(11) SCHROETER. — Ueber d. Bakt. geb. Pigmente. (Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen, I, 2^e p.), 1875.

artificielles, sans toutefois leur être identique, et qu'elle provient de l'albumine contenue dans le milieu de culture.

Plus tard, Otto Helm (1), après avoir reproduit les expériences de ces deux derniers auteurs, démontre leurs profondes erreurs.

Enfin arrive Neelsen (2), qui, en 1880, publie un travail extrêmement important et des plus intéressants sur le « lait bleu ».

Il confirme tout d'abord les expériences de Haubner : Tous les laits, sans exception, de quelque animal qu'ils proviennent, donnent le phénomène de pigmentation, qui peut également se montrer sur les substances contenant de l'albumine végétale. Par contre, l'albumine de provenance animale et la caséine chimiquement pure ne donnent aucun résultat. Le *liquide de Cohn*, additionné de lactate d'ammoniaque, produit également la matière colorante.

Neelsen étudie ensuite l'action de différents phénomènes physiques et chimiques sur la formation du « lait bleu ».

Il remarque, entr'autre, que les variations atmosphériques ont une grande influence.

Le bleuissement du lait est accompagné d'une production d'acide lactique et d'une décomposition de la caséine, que la bactérie amène auparavant à un état spécial. En même temps, il se forme une certaine quantité d'acide carbonique.

Neelsen donne ensuite les réactions caractéristiques de la matière colorante, en fait l'étude au spectroscope, et montre ainsi l'erreur d'Erdmann qui l'identifiait à la Triphénylrosaniline. Le spectre du pigment, qu'une base forte a fait virer au rouge, a une grande analogie avec celui de l'Éosine, sans cependant lui être identique.

Cet auteur conclut que la formation du pigment bleu est due à l'acide lactique provenant du lactose, et à l'ammoniaque fournie par la fermentation de la caséine. Mais il n'a

(1) OTTO HELM, — Reichard's Archiv der Pharmacie, 1875.

(2) NEELSEN, — Studien über die blaue Milch. (Cohn's Beiträge zur Biol. der Pflanzen III, 2^e p., 1883.

pas pu reconnaître que l'acide lactique n'était pas produit par la bactérie du « lait bleu », mais par une fermentation lactique secondaire. Enfin il nie la toxicité de la matière colorante.

J. Reiset (1) a observé pendant de nombreuses années le phénomène du « lait bleu » dans ses fermes de Normandie. Il en donne une description très exacte. Ses premiers soins, pour essayer d'enrayer le mal, furent de faire suivre un traitement à ses vaches ; mais ce fut sans résultat. Il arriva à son but en ajoutant au lait 0^{gr},5 d'acide acétique cristallisable par litre. Il recommande, en outre, l'emploi de vases très propres et bouillis. L'insuffisance de son microscope ne lui a pas permis de reconnaître la cause du phénomène. Il incrimine la pauvreté du sol en éléments calcaires, les herbages trop fumés, et surtout l'eau des mares, dont les bactéries se répandent dans l'organisme du bétail.

Hüppe (2) est le premier, qui, en 1883, obtint des cultures pures du ferment, cause du phénomène du « lait bleu ».

On comprend alors pourquoi Neelsen attribuait tant de formes à cette bactérie.

Hüppe fit de nombreuses cultures sur différents milieux et constata l'influence très grande de l'acidité originale du milieu sur la formation de la matière colorante.

Comme Hüppe, Scholl (3) suppose que le pigment bleu est un sel dont la base serait NH_3 et l'acide, un acide appartenant à la série grasse.

En 1889, Heim (4) publia ses travaux sur le « lait bleu ». Ils ne jettent aucun jour nouveau sur les conditions biologiques de la bactérie et ne sont, en somme, que la confirmation des résultats obtenus par Hüppe.

(1) J. REISET. — Observations sur le lait bleu. (C. R. de l'Acad. des Sciences, 1883, I., p. 682 et 745).

(2) HÜPPE. — Untersuch. über die zersetzung der Milch durch Microorganismen. (Mith. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, II, 1884, p. 335).

(3) SCHOLL. — Contribution à la connaissance des décompositions du lait par les microorganismes: Sur le lait bleu. (Fortschritte der Medicin, 1889, n° 21).

(4) HEIM. — Versuche über blau-Milch. (Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte. V. 1890, p. 518).

P. Behr (1) signale, en 1890, une race du bacille du « lait bleu » qui, depuis vingt mois, ne donne plus de matière colorante. Et, cependant, cette variété est absolument identique aux autres qui produisent le pigment bleu.

L'auteur se demande si cette perte du pouvoir chromogène n'a pas quelque analogie avec la perte de la virulence.

Gessard (2) remarque que le bacille du « lait bleu » possède deux fonctions : l'une chromogène, l'autre fluorescente, et arrive à les séparer. Il constate et explique l'utilité du glucose dans les bouillons de culture. Son étude sur la formation du pigment n'arrive pas à élucider le phénomène. Enfin il conclut que, dans le lait, la formation du pigment est due à une symbiose, car la bactérie serait incapable d'utiliser toute seule les éléments du lait pour produire la matière colorante bleue.

En 1895, le Dr K. Thümm (3) publie une étude extrêmement intéressante sur les bactéries fluorescentes, où il compare les deux races du *Bacillus Sincyanus*, et donne les moyens de les différencier.

Teïsi Matzuschita (4) donne, en 1901, les températures de culture du bacille du « lait bleu ».

Enfin, en 1902, Maassen (5) a constaté que dans un bouillon contenant 0,50 % de salpêtre et 5 % de peptone, après quatre semaines de culture à 30°, on obtenait une certaine quantité de nitrite.

Cette même année, Paul Ernst (6), dans un travail général très important, étudie en passant la constitution du *Bacillus Sincyanus*.

(1) P. BEHR. — Ueber eine nicht farbstoffbildende Race des Bacillus der blauen Milch. (Cent. Blatt f. Bakt. VIII, 1890, p. 485).

(2) GESSARD. — Fonctions et races du bacille cyanogène. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. V., 1891, p. 737).

GESSARD. — Microbes chromogènes : Pus bleu et lait bleu. (Conf. faite à l'Inst. Pasteur, le 9 avril 1892. Revue scientifique, 1892, n° 49, p. 571).

(3) Dr K. THÜMM. — Beiträge zur biologie der fluorescierenden Bakterien. (Arb. des bakt. Instituts der grossh. Hochschule zu Karlsruhe, 1895).

(4) TEÏSI MATZUSCHITA. — Der Einfluss der Temperatur und Ernährung auf die Eigenbewegung der Bakterien. (Centr. Blatt. VII, n° 7, 1901).

(5) MAASSEN. — Die zersetzung der nitrate und der nitrite durch Bakterien. (Cent. Blatt. VIII, p. 152, 1902).

(6) P. ERNST. — Ueber den Bau der Bakterien. (Central blatt. VII, p. 34, 1902).

Ces travaux antérieurs peuvent ainsi se résumer :

Dans le lait, une formation de lactate d'ammoniaque est indispensable pour qu'il y ait production de pigment bleu.

Ensemencé dans du lait, ne présentant pas de fermentation lactique, le *Bacillus Syncyanus* ne donne pas de matière colorante, et le milieu devient basique ou augmente de basicité par suite de la transformation de la caséine en ammoniaque.

Par addition de petites quantités d'acide lactique pour acidifier très légèrement à l'origine le milieu de culture, on obtient une faible production de pigment d'une teinte gris sale, qui n'a rien de comparable avec la belle teinte bleue constatée ordinairement.

Le *Bacillus Syncyanus* est donc incapable d'attaquer le lactose et de le transformer en acide lactique; pour ce travail il lui faut l'intervention d'une fermentation secondaire.

Cette bactérie produit trois races différentes : 1^o la race chromogène proprement dite ; 2^o la race fluorescente ; 3^o une race dépourvue de tout pouvoir chromogène.

Le but principal de notre travail devait être l'étude du pigment bleu, fourni par les *Bacillus Syncyanus*. Nous ne nous sommes donc attaché qu'à la culture de la race chromogène.

Si nous avons obtenu les deux autres races, ce n'est que par accident. Nous n'avons constaté, d'ailleurs, qu'une seule fois le phénomène de fluorescence ; par contre, nous avons eu assez souvent des cultures de la race dépourvue de pouvoir chromogène.

Pour les mêmes raisons que M. Macé, nous donnons au bacille du « lait bleu » le nom de *Bacillus Syncyanus*, qui est l'appellation la plus ancienne. Elle lui a été attribuée par Ehrenberg en 1838.

Notre travail a été exécuté dans les laboratoires de M. Petit, Professeur de chimie agricole à la Faculté des Sciences de Nancy, Directeur de l'Ecole de Brasserie, et d'après ses bienveillants conseils. Nous sommes heureux de lui exprimer ici nos sentiments les plus sincères de profonde et respectueuse reconnaissance.

MARCHE GÉNÉRALE D'UNE CULTURE DU « *BACILLUS SYNCYANUS* »

Les phénomènes remarquables produits par le *Bacillus Syncyanus* sont fonctions de deux causes principales :

La composition du milieu de culture et la température.

A une température déterminée, à 22° par exemple, — température à laquelle ont été faites toutes nos recherches, — et dans un milieu favorable au développement normal de la bactérie et à la production de son pigment bleu, on constate trois phases distinctes dans le cycle de la vie du *Bacillus Syncyanus* :

La végétation bactérienne, — la production du pigment, — la décoloration.

36 heures après l'ensemencement, le milieu de culture s'est troublé, et il se forme en surface un léger voile blanc opalescent.

C'est vers la 48^e heure que commence à se manifester le phénomène de pigmentation :

Il se produit dans le voile blanc un anneau bleuté, qui court tout le long de la paroi du ballon. Peu à peu, cet anneau s'élargit et arrive à couvrir toute la surface de la culture. Puis, les couches inférieures du bouillon se teintent de façon à former un dégradé, qui offre en surface la coloration bleue la plus foncée.

Vers le quatrième jour, le phénomène présente son maximum d'intensité. Les couches superficielles sont alors d'un beau bleu-indigo très franc. De plus, en surface, l'on voit de petites pellicules, brillant d'un éclat métallique, et ressemblant à la fleurée d'indigo. La coloration s'étend alors au tiers du flacon.

Puis arrive la décoloration, qui se fait déjà sentir un peu avant le sixième jour. Le bleu devient sale, tourne au vert. Une teinte bleu-verdâtre s'étend dans tout le flacon, et il commence à se former un précipité noir. La matière colo-

rante vire ensuite au brun foncé, et enfin précipite au fond du flacon.

Peu à peu, le bouillon de culture se clarifie et reprend sa teinte jaune primitive. Il reste en surface un anneau noir, accroché aux parois du ballon, et, au fond, un précipité assez volumineux brun très foncé.

Quelles sont les causes et les conséquences de ces transformations successives ? C'est ce que nous allons nous efforcer de rechercher.

Morphologie

N'ayant pas constaté d'autres formes que celles décrites par M. Macé, dans son *Traité pratique de bactériologie*, nous ne pouvons mieux faire que de lui emprunter ces descriptions :

« Les éléments du *Bacillus Syncyanus* du lait sont des bâtonnets lentement mobiles, dont la longueur varie de $2\ \mu$ à $4\ \mu$ pour une épaisseur de $0,5\ \mu$; les extrémités sont arrondies. Lorsqu'ils forment de petites zooglées muqueuses, on peut leur reconnaître une auréole hyaline, sorte de capsule de gelée. La formation de spores s'observe facilement à la température ordinaire. Les spores, sont ovoïdes, un peu plus grosses que les bâtonnets, qui se renflent à l'endroit où elles se reproduisent. C'est, d'habitude, à une extrémité : le bâtonnet prend alors une forme de massue ; c'est, parfois, au milieu ; il devient fusiforme.

« Dans les cultures sur milieux liquides, il se produit souvent des formes d'involution bizarres. On trouve des aspects curieux, éléments gonflés en ballons, rubanés, sinueux, que Neelsen a observés dans la *solution de Cohn*, à laquelle il ajoutait un peu de nitrate de potasse ; Hüppe en a obtenu de tout semblables dans les solutions de tartrate d'ammoniaque. »

La mobilité du *Bacillus Syncyanus* varie suivant la nature du milieu, la température et l'âge de la culture.

Nous avons constaté que ces bâtonnets présentent leur maximum de mobilité dans un bouillon favorable à la pro-

duction du pigment bleu, cultivé entre 20° et 22°, et 72 heures environ après l'ensemencement.

Au contraire, dans les bouillons où le pigment ne se produit pas, ou se produit mal, — bien que ces bouillons soient favorables à la vie et au développement de la bactérie, — ou à des températures supérieures à 25° et inférieures à 20°, la mobilité des bâtonnets diminue, devient très faible et même s'annule complètement. Dans ces cas, on constate toujours la formation de spores.

Le voile superficiel présente l'aspect de gelée opalescente, renfermant les bactéries immobiles.

Les cultures sur plaques gélatinées, provenant d'un milieu favorable à la production du pigment, offrent un aspect très intéressant.

Il se forme de petites colonies en bouton, ayant environ un demi-millimètre de diamètre. Le bouton devient bleu-indigo très foncé. De plus, lorsqu'il se trouve à la surface de la gélatine, il s'entoure d'une auréole d'un bleu-saphir très intense, pouvant atteindre jusqu'à 1 ou 2 centimètres de diamètre.

Lorsque la bactérie est prisonnière dans la masse gélatinée, elle forme également une petite colonie bleu foncé, mais alors son auréole est extrêmement réduite et peut même ne pas exister.

Quand les colonies sont suffisamment rapprochées, la plaque gélatinée, après quatre jours de culture, prend tout entière une teinte bleue intense superbe, qui persiste pendant une huitaine de jours. Elle passe ensuite au vert, puis au brun, mais bien plus lentement que ne le fait un bouillon de culture.

Une colonie prélevée sur cette plaque, soit en superficie, soit au sein du milieu gélatiné, et réensemencée dans un bouillon favorable, nous a toujours reproduit le pigment bleu.

Influence de la température

Cet agent physique a une double influence sur une culture du *Bacillus Sincyanus*.

Dans un milieu favorable, la température agit tout d'abord sur la production du pigment bleu, puis sur la vie de la bactérie.

De 5° à 10°, la bactérie végète. Mais si, ensuite, on porte la culture à 20°, elle se développe et produit son pigment. Un passage répété et prolongé à ces basses températures ne lui fait pas perdre son pouvoir chromogène.

Entre 10° et 25°, la bactérie se développe plus ou moins rapidement en produisant son pigment coloré.

Ce pigment est d'un bleu plus ou moins intense et net avec un maximum vers 18°-20°.

Par contre, la coloration bleue se prolonge beaucoup plus longtemps à 10° qu'à 20° et 25°.

A 30°, le développement se trouve déjà très affaibli. La coloration bleue n'apparaît plus et il ne se forme pas de voile superficiel. Vers le troisième jour, il se produit un trouble brun-jaunâtre sale. Les bactéries ne présentent plus qu'un faible mouvement et sporulent déjà beaucoup.

A 35°, on ne constate plus qu'un développement extrêmement faible accompagné, vers le troisième jour, d'un très léger trouble. Les bactéries ne présentent plus aucun mouvement et ont presque toutes formé des spores.

Le *Bacillus Sincyanus* supporte très difficilement les températures au-dessus de 40°. Sa vie est presque toujours détruite dans ces conditions plus ou moins rapidement.

Après dix jours de culture, mettons à l'étuve à 20° des ballons qui ont été expérimentés à 30° et 35° et qui n'ont ainsi donné qu'un très faible développement et aucune production de pigment.

Le ballon cultivé à 35° présente à ce moment au microscope un développement bactérien extrêmement faible.

Quarante-huit heures après, un nouvel examen microscopique nous permet de constater un développement intense

de bactéries normales. Le bouillon offre un trouble très grand jaune sale, mais sans trace de coloration bleue. Les jours suivants, il ne se produit aucune apparition de pigment. Nous avons fait, avec cette culture, une dizaine de réensemencements successifs dans différents bouillons. Les bactéries s'y multipliaient normalement; mais, même dans les milieux les plus favorables à la production de la matière colorante, jamais nous n'avons pu obtenir la réapparition du pigment bleu.

Le ballon cultivé à 30° n'avait donné qu'un développement bactérien très médiocre. Quarante-huit heures après avoir été porté à l'étuve à 20°, il offre une coloration bleue sale. Au microscope, nous constatons un développement très intense de bactéries douées d'une grande mobilité. Le lendemain, l'intensité de la coloration a un peu augmenté et il commence à se former un précipité. Les réensemencements provenant de cette culture ont toujours reproduit le phénomène de pigmentation.

Nous pouvons donc conclure de ces expériences, que le pouvoir chromogène se trouve suspendu à 30°, mais non pas supprimé; au contraire, il est complètement aboli pour les bactéries provenant de milieux cultivés à 35° et cela au moins pour un très grand nombre de générations, probablement même pour toujours.

Lorsque le passage à l'état de spores est dû à l'élévation de température, les générations successives provenant de ces spores produisent une race non-chromogène.

MILIEUX DE CULTURE

Cette étude est forcément très complexe et quelques travaux se sont déjà attaqués à ce sujet. Les très belles et intéressantes recherches de M. Gessard (1) ont jeté une grande lumière sur cette question si ardue.

(1) Ann. de l'Institut Pasteur, Tome V, 1891, p. 737.

Pour en simplifier l'étude, nous ne prendrons aucun milieu de culture naturel, lait, bouillon de bœuf, pomme de terre, etc. Car l'analyse des phénomènes y est trop difficile à suivre ou souvent même impossible.

Tous nos efforts ont tendu à obtenir un bouillon synthétique de composition aussi simple que possible et produisant à coup sûr le pigment bleu.

Lesensemencements sont faits dans des milieux de culture qui, après stérilisation, sont toujours neutres ou mieux très légèrement acides à la phénol-phtaléine ; car nous avons constaté que cette condition était nécessaire pour obtenir une belle production de pigment.

Le *Bacillus Syncyanus* exige, pour vivre et produire la matière colorante bleue dans un milieu synthétique, une source d'azote, de carbone et un sel minéral.

Nous allons maintenant rechercher sous quelle forme il faut offrir ces éléments à la bactérie pour obtenir les meilleurs résultats.

Influence de l'Azote

Peptone. — Dans un bouillon à 3 % de glucose massé ordinaire et 0,2 % de peptone sèche, le *Bacillus Syncyanus* se développe très bien, mais sans produire ni pigment bleu ni fluorescence.

Nous laisserons donc la peptone de côté, puisque ce corps ne donne pas la matière colorante que nous désirons obtenir. Nous avons constaté avec ce corps la formation d'ammoniaque.

Albumine. — Une solution à 3 % de glucose ordinaire et 0,8 % d'albumine sèche, puis filtrée sous pression sur une bougie Chamberland, ne nous a donné que de mauvais résultats.

Tout d'abord, il ne se produit aucune formation de pigment bleu. De plus, le *Bacillus Syncyanus* vit mal dans ce milieu. Il y végète et se développe peu. Enfin, après plusieurs générations, en général 4 à 5, la bactérie, réensemencée dans un milieu favorable à la production de son

pigment, reprend vigueur et se développe normalement, mais sans sécréter de matière colorante. Il nous a été rarement possible, dans la suite, d'arriver à lui rendre son pouvoir chromogène.

Urée. — Ce corps, pas plus que les précédents, ne nous a donné de bons résultats pour la formation du pigment. Dans une solution à

3 % de glucose ordinaire, 0,5% $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ et 0,4% SO_4Mg , le *Bacillus Syncyanus* se développe médiocrement, mais sans produire de matière colorante.

Asparagine. — Un des premiers bouillons, que nous avons utilisé avec quelques succès, était composé de 3 % de glucose ordinaire et 0,5 d'asparagine. Nous avons été amenés par la suite, comme nous le verrons plus loin, à ajouter à ce milieu 0,4 % de SO_4Mg .

Dans ce bouillon, le *Bacillus Syncyanus* se développe admirablement. Vers le cinquième jour, il se forme un anneau bleu superficiel qui court le long des parois.

Les jours suivants, la coloration s'étend à toute la partie supérieure du liquide avec formation en surface de points brillants d'un éclat mordoré. Puis le bleu tourne au gris-vert, au gris-ardoise et enfin précipite vers le dixième jour.

Nous avons constaté dans ces milieux une augmentation d'acidité pendant les six premiers jours. Cette acidité reste ensuite à peu près stationnaire, pour décroître enfin très légèrement vers le neuvième jour. Nous étudierons du reste plus en détails ce phénomène dans un milieu approprié.

La végétation bactérienne produit dans ce milieu une formation notable d'ammoniaque.

Bien que de composition assez simple, donnant un bon développement des bactéries et une formation convenable de pigment bleu, nous avons dû abandonner le milieu glucose-asparagine- SO_4Mg pour différentes raisons.

Tout d'abord, il est impossible de doser de manière exacte l'Azote ammoniacal qui se forme en présence de



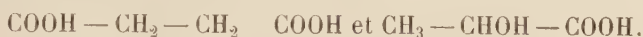
car, même dans le vide à 35°, distillée avec MgO, une solution d'asparagine se dissocie et laisse passer des quantités très variables de NH_3 .

Enfin, dans ce bouillon, qui nous avait donné d'excellents résultats au début, après quelques mois de culture, le *Bacillus Syncyanus* ne produisait plus qu'un pigment bleu sale et même a cessé totalement de nous donner de la matière colorante sans que nous eussions modifié en quoi que ce soit la composition du milieu.

Sels ammoniacaux

D'après les travaux antérieurs, deux acides organiques, l'acide succinique et l'acide lactique avaient donné de bons résultats, tant pour le développement du *Bacillus Syncyanus* que pour la production de son pigment.

Il nous a paru intéressant de rechercher si d'autres acides bibasiques ou acides-alcools pourraient jouer le même rôle que



Mais aucun de nos essais ne nous a donné de résultats satisfaisants. Jamais nous n'avons pu obtenir la formation du pigment bleu, et même quelquefois — avec l'oxalate d'ammoniaque entre autres — le *Bacillus Syncyanus* se développait mal.

Nous avions espéré surtout obtenir des résultats intéressants avec l'*Acide tartrique*



à cause de sa parenté avec l'*Acide succinique*,



Mais les deux groupements hydroxyles ne favorisent pas la formation de la matière colorante. Et cependant avec l'acide lactique, qui est également un acide alcool,



on obtient le phénomène de pigmentation. Toutefois, la bac-

térie se développe convenablement dans un milieu au tartrate d'ammoniaque.

Nous n'avons été guère plus heureux avec un bouillon au *Citrate d'ammoniaque*. C'est à peine si l'on obtient une vague teinte verdâtre.

Parmi les sels ammoniacaux minéraux, PO_4HAM_2 nous a donné d'assez bons résultats, bien que le bouillon ait été basique à l'origine. Nous verrons d'ailleurs, plus loin, qu'une certaine basicité n'est pas un obstacle absolu à la formation du pigment coloré. Trois jours après l'ensemencement de ces bouillons contenant : glucose pur 2 %, PO_4HAM_2 0,50 % et SO_4Mg 0,4 %, il se produit une coloration assez intense vert feuille morte, qui passe rapidement au brun en 48 heures environ.

Le $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Am}$ donne de meilleurs résultats, précisément à cause de son acidité. On n'obtient pas cependant une matière colorante d'un bleu aussi net qu'avec le lactate et surtout le succinate d'ammoniaque.

Une culture, provenant d'un bouillon au PO_4HAM_2 et réensemencée dans un milieu à 3 % glucose pur, asparagine 0,5 % et SO_4Mg 0,5 % nous a produit, une fois, un curieux phénomène de fluorescence. Cette culture, qui était très légèrement acide au début (l'acidité de 100 cm³ correspondait à 9 cm³ de NaOH n/20 à la phénol-phtaléine) était devenue très nettement basique. Il fallait 28 cm³ de SO_4H_2 n/40 pour faire disparaître la fluorescence de 100 cm³ de ce bouillon et près de 40 cm³ de SO_4H_2 n/40 pour faire virer la phénol-phtaléine. Cependant, sept autres flacons témoins, de glucose-asparagine, ensemencés le même jour avec la même culture, donnaient une production normale de pigment bleu et un accroissement d'acidité.

Nous avons alors réensemencé cette culture fluorescente dans des bouillons glucose-asparagine, de composition exactement semblable ; mais les uns étaient rendus légèrement acides, d'autres étaient exactement neutres à la phtaléine, et les troisièmes légèrement basiques. Le *Bacillus Synchymanus* s'est parfaitement développé dans ces trois milieux, mais

le phénomène de fluorescence n'a pas réapparu, pas plus d'ailleurs que la formation du pigment bleu. Des cultures successives, dans toutes sortes de milieux favorables, n'ont pu rendre à la bactérie ni son pouvoir chromogène, ni son pouvoir fluorescent.

Au microscope, nous n'avons remarqué aucune modification morphologique de la bactérie.

Nous avons essayé ensuite, en repartant d'une culture normale du PO_4HAm_2 , de reproduire ce phénomène de fluorescence par réensemencement dans un bouillon de glucose-asparagine, de même composition que celui qui nous avait donné ce curieux résultat et tous nos essais ont toujours échoué. Dans la suite, nos diverses cultures, pour l'obtention du pigment bleu, ne nous ont jamais plus reproduit ce phénomène. Il était probablement causé par une symbiose, due à une infection accidentelle.

Les autres acides minéraux ne donnent que de mauvais résultats et même nuisent presque toujours à la vie de la bactérie.

Cependant, il est possible d'employer dans une culture le SO_4Am_2 , mais à la condition qu'on fournisse au *Bacillus Syncyanus* l'acide succinique sous une autre forme. Comme nous le verrons un peu plus loin, SO_4Mg est nécessaire à la bonne formation du pigment. Nous avons essayé de remplacer

$\text{CO}_2\text{Am} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CO}_2\text{Am}$
 et SO_4Mg par
 $\text{CO}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CO}_2$ et SO_4Am_2 .

Mg

Nous avons alors obtenu une formation bien plus sûre du pigment et surtout ce pigment était plus abondant et d'un bleu bien plus net et intense qu'auparavant.

Il était intéressant de constater que le *Bacillus Syncyanus* utilisait aussi bien l'acide sulfurique et l'acide succinique, qu'ils soient combinés à l'ammoniaque ou à la magnésie, pourvu que ces deux bases soient présentes.

Le succinate de chaux ne donne pas un aussi bon résultat, loin de là. De plus, il a l'inconvénient de former à la

stérilisation un succinate basique peu soluble. Une grande partie de l'acide succinique se trouve donc ainsi inutilisable.

Nous avons aussi essayé de fournir N sous la forme de la matière colorante produite par le *Bacillus Pyocyaneus*, la pyocyanine.

Nous avons obtenu et extrait la pyocyanine comme l'a indiqué M. Gessard (1). Nous l'avons ensuite combinée à l'acide sulfurique et ainsi obtenu une solution d'une superbe matière colorante rouge, mais malheureusement en trop faible quantité. Aussi, nos expériences ont-elles manqué suffisamment de précision pour pouvoir en tirer une conclusion. De plus, ce sel de pyocyanine était souillé de traces de SO_4Am_2 , malgré plusieurs purifications. Nous ne serions parvenus à nous en débarrasser complètement qu'en perdant presque la totalité de cette précieuse base.

Influence des hydrates de carbone

Comme M. Gessard (2) l'a déjà observé dans les milieux synthétiques, la présence de *Glucose* est nécessaire à la production du pigment bleu. D'après cet auteur, cet hydrate de carbone fournit une augmentation d'acidité nécessaire et remplace ainsi le phénomène de symbiose, la fermentation lactique, que l'on constate toujours dans le lait lorsqu'on y observe la formation d'une coloration bleue, due au développement du *Bacillus Sincyanus*.

Etait-il possible de trouver un succédané au *Glucose* ? C'est ce que nous n'avons pas manqué de rechercher. Dans les bouillons qui nous avaient déjà servi, formés de 0,4 % SO_4Am_2 et 0,5 % succinate de magnésie, nous avons remplacé les 3 % de *Glucose* par différents sucres, en en cherchant le taux le plus favorable. Malheureusement, tous nos essais n'ont abouti qu'à des échecs.

(1) GESSARD. — De la pyocyanine et son microbe. — Thèse de Paris, 1882.

(2) GESSARD. — Fonctions et races du bacille cyanogène (Ann. de l'Inst. Pasteur, 1891).

Nous avons tout d'abord employé le *Lévulose*, à cause de sa proche parenté avec le *Glucose*. Nous avons obtenu un développement normal de la bactérie, mais sans production de pigment. Le bouillon qui, au début, avait une acidité correspondant à 10 cm³ de Na OH n/20 pour 100 cm³, était devenu basique. Cette basicité était neutralisée à la phtaléine par 8,8 cm³ de H₂ SO₄ n/40 pour 100 cm³.

Avec le *Xylose*, le développement même de la bactérie était à peu près nul.

Le *Maltose* ne nuit pas à la vie du *Bacillus Syncyanus*, mais, cependant, il n'est pas consommé. Nous avons pu constater, par des dosages de ce sucre, au début et huit jours après l'ensemencement, que le taux de ce corps n'avait diminué que d'une façon extrêmement faible.

L'acidité du milieu n'avait pas augmenté.

Nous avons également ensemencé le *Bacillus Syncyanus* dans une infusion de malt stérilisée et légèrement acidulée. La bactérie y végète normalement, mais sans produire de pigment.

Le *Saccharose* convient mal au développement du bacille. Il ne produit aucune coloration et n'est pas inverti. Même par addition d'une trace de levure, on n'obtient pas de meilleurs résultats.

Nous avons également essayé un bouillon additionné de 5 cm³ % d'empois d'amidon. Dans un ballon, nous avons ensemencé directement le *Bacillus Syncyanus*, et, dans un autre, nous n'avons fait la culture qu'après avoir ajouté quelques centimètres cubes d'une infusion de malt. Dans l'un comme dans l'autre cas, les résultats obtenus ont été négatifs.

Influence des sels minéraux

La nécessité de la présence de sels de magnésium avait déjà été reconnue pour obtenir une belle formation de pigment coloré.

Nous avons recherché quelle était la dose optima pour le

$\text{SO}_4 \text{ Mg}$, en la faisant varier de 0,005 % à 5 %. Nous avons constaté qu'elle se trouvait entre 0,4 et 0,5 %.

Nous avons également fait ces essais pour le succinate de Mg , et avons trouvé qu'un bouillon, à 3 % de glucose ordinaire, 0,4 % $\text{SO}_4 \text{ Am}_2$ et 0,5 % succinate de Mg , donnait les meilleurs résultats.

Il était intéressant d'essayer de remplacer le magnésium par le calcium. Mais le sulfate, et surtout le succinate de Ca , ont l'inconvénient de n'être pas assez solubles. Les résultats obtenus avec ces deux sels ont été très médiocres.

C'est en changeant le glucose ordinaire que nous employions, et surtout en utilisant du glucose « chimiquement » pur, que nous avons reconnu la nécessité absolue de la présence de $\text{PO}_4 \text{ H}_3$ pour obtenir une belle formation de matière colorante.

Les cendres de 100 grammes de notre premier glucose, qui nous donnait de bons résultats, contenaient 0 gr. 63 de $(\text{PO}_4)_2 \text{ Ca}_3$, tandis que le second ne contenait que 0 gr. 10 de $(\text{PO}_4)_2 \text{ Ca}_3$ et ne donnait qu'un vilain pigment peu abondant. Avec le glucose pur, on n'obtenait plus trace de matière colorante.

Nous avons reconnu qu'avec le glucose pur, il fallait ajouter 1 gramme de $(\text{PO}_4)_2 \text{ Ca H}_4$ par litre de bouillon pour avoir des résultats satisfaisants. Ils étaient, cependant, loin d'être comparables à ceux obtenus avec le glucose ordinaire contenant du phosphore organique.

Le phosphate acide de chaux peut, à la rigueur, être remplacé par $\text{PO}_4 \text{ H}_2 \text{ K}$, mais il nous a semblé que le sel de chaux lui était préférable.

$\text{PO}_4 \text{ H K}_2$ ne donne que de médiocres résultats, car il manque alors l'acidité initiale, nécessaire à la bonne production du pigment.

H Cl , combiné à quelque base que ce soit, ne favorise pas la formation de matière colorante, et même nuit, en général, au développement du *Bacillus Sincyanus*, excepté sous forme de Na Cl et Ca Cl_2 .

Nous avons également essayé l'effet des sels de fer et

manganèse, au maximum et au minimum. Même à l'état de traces, ils nuisent à la production du pigment bleu.

Le bouillon de culture dont Fraenkel et Voges donnent la composition :

Na Cl.....	3 grammes
PO ₄ H K ₂	2 —
Lactate d'Am.....	6 —
Asparagine.....	4 —
Eau.....	1.000 —

convient admirablement au développement du *Bacillus Synchronus*. Il se forme en surface un voile muqueux extrêmement épais et tout le liquide devient opalescent. Mais la production de pigment y est impossible. En ajoutant 3 % de glucose, il se produit une légère teinte bleutée qui augmente d'intensité en diminuant la dose de Na Cl.

INFLUENCE DE L'AIR ET DE DIFFÉRENTS GAZ SUR LA PRODUCTION DU PIGMENT

L'air est essentiellement nécessaire, non seulement à la vie du *Bacillus Synchronus*, mais encore à la production de son pigment.

Nous avons fait divers essais, en empêchant l'air de se renouveler dans la culture ; pour cela, nous avons fermé hermétiquement nos flacons à différents moments.

Si nous pratiquons cette fermeture immédiatement après l'ensemencement, sur une série de flacons, en examinant 24 heures après l'une des cultures au microscope, nous constatons un développement normal des bactéries, qui ne diffèrent nullement de celles prélevées dans un flacon témoin non bouché.

Dans la suite, le développement bactérien se trouve un peu retardé et est légèrement moins intense que dans les flacons témoins.

mais d'une façon un peu moins intense qu'avant la filtration.

Nous avons ensuite remis ce bouillon filtré dans l'étuve à 20°. Le lendemain, alors qu'une culture témoin non filtrée commençait à donner une belle coloration bleue, le bouillon d'épreuve n'avait pas changé comme on pouvait le supposer. Nous y avons vérifié la réaction oxydasique et avons constaté qu'elle avait considérablement diminué et n'était plus que très faible. 36 heures après la filtration, elle n'existait plus.

Nous avons, quelques jours après, réensemencé ce bouillon filtré et resté incolore; il est admirablement reparti et a donné une très belle matière colorante bleue.

Il était ensuite intéressant de vérifier l'action de l'*Oxydase* sur une culture ne donnant pas de pigment coloré. Pour cela, nous avons préparé trois bouillons. L'un, selon notre formule, capable de fournir le phénomène de pigmentation; les deux autres à : 3 % glucose *pur*, 0,5 % succinate de Mg et 0,4% SO_4Am_2 . Ces deux derniers étant dépourvus de $(\text{PO}_4)_2\text{CaH}_4$ ne devaient nous donner ni *Oxydase* ni matière colorante. Nous ensemençons en même temps ces trois ballons. 24 heures après, nous constatons que le bouillon I donne une très belle réaction oxydasique; les deux autres ne présentent à aucun degré ce phénomène.

Nous filtrons le bouillon I comme nous l'avions déjà pratiqué. Après avoir recueilli le filtrat dans les plus grandes conditions d'aseptie et vérifié qu'il donnait encore la réaction oxydasique, mais sensiblement diminuée, nous avons ajouté au bouillon II 25 cm³ de ce bouillon I, et au bouillon III un volume égal au volume de la culture.

Le lendemain, ni II ni III ne présentent de traces de pigmentation, tandis qu'une culture normale témoin commence à se colorer en bleu. De plus, II ne donne pas de réaction oxydasique, mais III produit une coloration rouge-violacé assez nette avec une solution du réactif. Cette réaction est plus franche que celle du bouillon I après filtration.

Le surlendemain, II présente un développement bactérien normal, mais sans production de pigment.

Le bouillon III fournit, au contraire, une petite quantité

pigment assez abondant, mais moins coloré et moins net.

Enfin, l'acidité maxima était neutralisée par $48\text{cm}^3,5$ de $\text{NaOH N}/_{20}$.

La seconde a été filtrée au moment du maximum d'intensité du bleu. Son acidité, à ce moment, correspondait à $74\text{cm}^3,5$ de soude titrée. Le bouillon filtré n'était plus bleu ; il présentait un aspect dichroïque rouge et vert. Nous l'avons réensemencé, mais les bactéries y ont végété péniblement sans produire de matière colorante ni d'augmentation d'acidité.

Enfin, la troisième culture n'a été filtrée qu'après la précipitation complète de la matière colorante. Son acidité correspondait à ce moment à $80\text{cm}^3,8$ de $\text{NaOH N}/_{20}$ pour 100 cm^3 .

Après réensemencement, les bactéries ne s'y sont non seulement pas développées, mais 8 jours après elles étaient mortes.

Nous avons alors ramené l'acidité de cette culture à l'acidité initiale en la neutralisant avec une solution de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, puis l'avons réensemencée. Les bactéries se sont alors très bien développées et ont produit de la matière colorante. Mais, ce pigment était loin d'avoir l'éclat et l'intensité qu'il avait atteints dans la première culture.

L'acidité, qui correspondait au début à 21 cm^3 de $\text{NaOH N}/_{20}$, était neutralisée au moment de l'apparition du bleu par $28\text{cm}^3,5$ et par $45\text{cm}^3,5$ à la précipitation de la matière colorante.

Nous avons encore répété deux fois cette filtration et neutralisation, mais chaque fois la production de matière colorante était plus faible ; le développement des bactéries était cependant normal.

Nous croyons pouvoir attribuer, en partie du moins, la diminution de la production du pigment à la diminution de la quantité d'acide phosphorique en dissolution, car après avoir ajouté une faible quantité de $(\text{PO}_4)_2\text{CaH}_4$, nous avons obtenu une plus forte production du pigment, mais sa coloration manquait tout à fait de netteté.

moment où commençait à bien se former le pigment coloré, nous attelions notre ballon de culture à une trompe à eau par l'intermédiaire d'un robinet à trois voies et de filtres à air. Nous faisons le vide aussi complètement que possible, puis laissons rentrer lentement dans le ballon de l'hydrogène ou de l'acide carbonique filtré.

CO₂ donne un assez mauvais résultat : il ne retarde pas la décoloration, au contraire ; la matière colorante forme rapidement un précipité noirâtre.

Avec l'hydrogène, la décoloration est sensiblement retardée et ne se produit pas de la même façon que dans les flacons simplement bouchés pour empêcher l'air de se renouveler. Au lieu de passer au vert, puis au brun, la matière colorante pâlit, devient gris-ardoise très pâle, puis précipite en gris-clair.

Dans les cultures ordinaires, la formation de la matière colorante est due à une oxydation ; son changement de couleur et sa précipitation à une peroxydation. Il nous avait paru possible d'admettre que, dans les cultures où l'on remplace l'air par de l'hydrogène, la décoloration était due à une réduction : les bactéries privées subitement, au moment de leur plus grande activité, de l'oxygène qui leur est indispensable, défendraient leur vie en puisant cet oxygène nécessaire dans la matière colorante bleue qui serait ainsi décolorée par réduction. Mais, nous n'avons pu vérifier cette hypothèse. Car, il eut fallu rendre au précipité sa couleur primitive en le réoxydant. Nous avons essayé de le faire, en traitant ce précipité par divers oxydants : courant d'air, d'oxygène, oxyde d'argent, H₂O₂, KMnO₄ et CrO₃. Il nous a été impossible d'arriver à un résultat appréciable.

Nous avons vu qu'en bouchant, dès le début, les flacons ensemencés, nous n'obtenions qu'un médiocre développement bactérien et surtout peu ou pas de matière colorante. Nous avons alors remplacé l'air par une atmosphère enrichie d'oxygène.

Jusqu'à 55 %, le *Bacillus Sincyanus* supporte très bien l'oxygène. Cette dose dépassée, il périlite et est tué vers 75-80 %.

Entre 30 et 55 % d'oxygène, il produit son pigment et l'on obtient un maximum d'intensité vers 45 %. Cependant, la matière colorante formée est bien loin d'être aussi belle, aussi intense et aussi franche que celle produite dans une atmosphère d'air ordinaire pouvant se renouveler.

CULTURE DANS LE MILIEU LE PLUS FAVORABLE

D'après les résultats obtenus dans ces premières recherches, nous avons cultivé le *Bacillus Syncyanus* dans le milieu synthétique qui nous avait donné les meilleurs résultats, et pour le développement de la bactérie et pour l'obtention du pigment bleu, c'est-à-dire dans un bouillon composé de :

Eau.....	1.000 grammes
Succinate de Mg	5 —
Sulfate de NH_3	4 —
Glucose	30 —

Nous ajoutons ensuite une quantité de $(\text{PO}_4)_2\text{CaH}_4$, telle que l'acidité de 25 cm³ du bouillon soit neutralisée à la phénol-phtaléine par 5-6 cm³ de NaOH n/20.

Dans ces conditions, la marche générale de la culture aux différentes températures de 35°, 30°, 25°, 20°, 15°, présente les phénomènes indiqués dans le tableau suivant :

DURÉE de culture	BALLON	TEMPÉ- RATURE	RÉSULTATS
24 heures	»	»	Pas de changements appréciables dans aucune des cultures.
40 heures	I	35°	Pas de développement.
»	II	30°	Développement faible sans coloration.
»	III	25°	Développement intense. Coloration bleue ardoise assez intense.

DURÉE de culture	BALLON	TEMPÉ- RATURE	RÉSULTATS
40 heures	IV	20°	Développement normal. Voile en surface. Faible commencement de coloration.
»	V	15°	Léger développement sans coloration.
48 heures	I	35°	Id. 40 heures.
»	II	30°	Id. 40 heures.
»	III	25°	Assez beau bleu.
»	IV	20°	Commence à bleuir sensiblement.
»	V	15°	Id. 40 heures + léger voile.
64 heures	I	35°	Léger développement sans voile ni coloration.
»	II	30°	Développement moyen sans voile ni couleur.
»	III	25°	Développement et coloration intense bleu sale.
»	IV	20°	Développement et coloration très intense, très beau bleu.
»	V	15°	Développement assez intense. Coloration moyenne vert feuille morte.
72 heures	I	35°	Très léger trouble. Au microscope : Développement très faible. Bactéries sans mouvement. Spores.
»	II	30°	Trouble jaune brun sale. Au microscope : Développement normal. Bactéries allongées. Peu de mouvement. Spores.
»	III	25°	Bleu ardoise sale. Au microscope : Développement intense. Bactéries normales. Grand mouvement.
»	IV	20°	Bleu foncé très net. Au microscope : Développement normal très intense. Bactéries normales. Très grand mouvement.
»	V	15°	Bleu ardoise assez foncé. Au microscope : Développement moyen. Bactéries allongées. Très peu de mouvement. Quelques spores.

DURÉE de culture	BALLON	TEMPÉ- RATURE	RÉSULTATS
90 heures	I et II	35° et 30°	Pas de changement.
»	III	25°	Bleu sale virant sur le brun, dépôt noirâtre.
»	IV	20°	Bleu foncé commence à devenir sale.
»	V	15°	Bleu ardoise foncé.
112 heures	I et II	35° et 30°	Pas de changement.
»	III	25°	Brun sale précipite en vert foncé sale.
»	IV	20°	Bleu vert foncé avec léger précipité noirâtre.
»	V	15°	Bleu foncé très net.
5 jours	I, II, III et IV	»	Pas de changement.
»	V	15°	Bleu superbe extrêmement intense.
6 jours	I et II	35° et 30°	Pas de changement.
»	III	25°	Passé.
»	IV	20°	La matière colorante précipite fortement.
»	V	15°	Bleu net.
7 jours	I, II et III	»	Pas de changement.
»	IV	20°	Comme la veille.
»	V	15°	Vire au vert. Commence à précipiter.
8 jours	I, II et III	»	Pas de changement.
»	IV	20°	Complètement passé.
»	V	15°	Vert sale. Précipite fortement.

Enfin, le dixième jour, toutes les cultures sont complètement passées. Au microscope, on ne voit presque plus de bactéries en suspension dans le bouillon. On les trouve mêlées au précipité qui présente un aspect noirâtre amorphe.

Dans les cultures à 15°, 20° et 25°, l'acidité initiale avait

environ doublé, tandis que dans la culture à 30° elle avait augmenté d'une façon insignifiante, et dans la culture à 35° n'avait pas varié.

Ces deux cultures à 30° et 35° qui n'ont donné qu'un faible ou même très faible développement bactérien, et pas trace de pigment coloré, transportons-les dans l'étuve à 20°.

Quarante-huit heures après, la culture à 35° donne un développement intense sans coloration.

La culture à 30° nous donne également un développement intense, mais avec une coloration bleu ardoise sale.

Le troisième jour, cette dernière culture est d'un bleu plus foncé, mais commence déjà à précipiter. La culture, qui a été portée à 35°, reste comme la veille, sans coloration.

Il s'est reformé dans ces deux flacons un nouveau développement de bactéries qui, dans un cas (30°), sont absolument normales et produisent, dans le même milieu et dans les ensemencements suivants, le phénomène de pigmentation.

Dans l'autre cas (35°), il se forme également une nouvelle génération de bactéries. Mais ces bactéries qui, au microscope, ne présentent aucune différence avec le *Bacillus Synchronus* normal, non seulement ne produisent pas de matière colorante dans le milieu qui a été porté à 35°, mais encore dans les cultures suivantes, ensemencées avec ces bactéries, dans un milieu et à une température favorables, le phénomène de pigmentation n'apparaît plus.

Ces bactéries ont perdu leur pouvoir chromogène.

Transformation des Éléments du milieu

Pour se développer et former son pigment bleu, le *Bacillus Synchronus* doit consommer les éléments qui lui ont été fournis dans le milieu synthétique.

Il était donc intéressant de suivre la marche de la disparition de ces éléments.

Pour cela, nous avons dosé toutes les 24 heures :

1° Le glucose, par pesée du cuivre réduit dans la liqueur de Fehling ;

2° L'ammoniaque, par distillation de 50 cm³ du bouillon de culture dans le vide, en présence de Mg(OH)₂, en condensant et recueillant ce qui passe dans un nombre connu de cm³ de H₂SO₄ n/4 ;

3° L'acidité, par titrage de 25 cm³ de bouillon avec NaOH n/20 en présence de phénol-phtaléïne.

Nous avons réuni, dans le tableau suivant, les résultats obtenus dans trois cultures ; la I ayant donné un bleu magnifique, la II un bleu passable et la III n'ayant pas produit de matière colorante. Ces différences étaient dues à la teneur en phosphate de chaux qui était grande dans I, moyenne dans II et faible dans III.

Tous les résultats ont été ramenés à 100 cm³ de bouillon de culture.

	I	II	III
Premier jour :			
Glucose	2 ^{gr} 0225	2 ^{gr} 014	1 ^{gr} 9072
NH ₃	0 1068	0 1050	0 1062
Acidité en H ₂ SO ₄	0 0647	0 0607	0 0490
Deuxième jour :			
Glucose	1 ^{gr} 973	1 ^{gr} 962	1 ^{gr} 8928
NH ₃	0 1039	0 1020	0 1052
Acidité en H ₂ SO ₄	0 0710	0 0652	0 0568
Troisième jour :			
Glucose	1 ^{gr} 6816	1 ^{gr} 846	1 ^{gr} 8816
NH ₃	0 0983	0 1004	0 1035
Acidité en H ₂ SO ₄	0 1078	0 0872	0 0637
Quatrième jour :			
Glucose	1 ^{gr} 387	1 ^{gr} 636	1 ^{gr} 8608
NH ₃	0 0932	0 0981	0 1016
Acidité en H ₂ SO ₄	0 1396	0 1087	0 0715

	I	II	III
Glucose	17.00	17.75	17.500
NH ₃	1.000	1.000	1.000
Acidité en H ₂ SO ₄	1.100	1.100	1.100
Sixième jour :			
Glucose	17.00	17.75	17.500
NH ₃	1.000	1.000	1.000
Acidité en H ₂ SO ₄	1.100	1.100	1.100

Fig. 8. — Résultats de la culture de *Streptococcus* dans le sérum.

	24 heures	48 heures	72 heures	96 heures	120 heures
Glucose en milligrammes :					
I	19.5	19.8	24.0	25.0	25.0
II	22	116	170	250	250
III	11.1	11.2	20.8	8.1	—
NH ₃ en milligrammes :					
I	1.8	4.0	10.0	17	25
II	2.7	9.0	14.5	25	25
III	3.1	1.7	10.7	6.7	—

Fig. 9. — Résultats de la culture de *Streptococcus* dans le sérum de H.S.

	24 heures	48 heures	72 heures	96 heures	120 heures
I	10.7	10.8	10.8	10.1	10
II	10.1	10.8	10.1	10.1	10.1
III	7.8	10.1	7.8	8.8	—

Il est assez curieux de constater, d'après ces résultats, que dans le premier cas, où il y a eu une production normale de matière colorante, le rapport entre le glucose disparu et l'augmentation d'acidité est à peu près constant.

$$I \quad \frac{6,3}{49,5} = 0,12 \quad \frac{36,8}{291,4} = 0,12 \quad \frac{31,8}{294,6} = 0,10 \quad \frac{6,1}{60} = 0,10$$

Dans le deuxième cas, cette constance est déjà bien faible.

$$II \quad \frac{4,9}{32} = 0,094; \quad \frac{21,8}{116} = 0,18; \quad \frac{21,3}{210} = 0,10; \quad \frac{16,7}{116} = 0,14; \quad \frac{3,9}{60} = 0,06$$

Enfin, dans le troisième, où il n'y a pas eu formation de matière colorante, cette constance n'existe pas.

$$\frac{7,8}{14,4} = 0,54 \quad \frac{6,9}{11,2} = 0,61 \quad \frac{7,8}{20,8} = 0,37 \quad \frac{3,9}{8,4} = 0,69$$

PRÉSENCE D'UNE OXYDASE

La sensibilité extrême que montre le *Bacillus Syncyanus*, pour la production de son pigment, à la moindre variation de la composition ou de l'état du milieu de culture et surtout à l'action de la chaleur, nous a fait présumer que la formation de la matière colorante n'était pas simplement due à l'action directe de la bactérie sur les-éléments du bouillon, mais bien à une action secondaire, conséquente de la vie de la bactérie, à une action diastasique.

N'est-il pas, en effet, à remarquer que si le *Bacillus Syncyanus* possédait par lui-même le pouvoir chromogène, la production du pigment bleu serait parallèle à la vie de la bactérie ?

Or, ce n'est que 48 heures après l'ensemencement que commence à apparaître une légère teinte bleue, tandis que nous constatons au microscope qu'après 24 heures de cultures à 20°, le développement bactérien est déjà assez intense.

Nous avons recherché, avec une solution alcoolique de

résine de Gaïac si, dans un échantillon de cultures commençant à bleuir, nous constatons la réaction bleue, caractéristique des diastases, avec ou sans addition d'eau oxygénée. Nous n'avons jamais pu obtenir un résultat positif.

Nous avons alors essayé un réactif des *Oxydases* indiqué par M. Grütz (1) et signalé auparavant par Wurster. C'est une solution aqueuse, incolore, faite au moment de nous en servir, de chlorhydrate de tétraméthyl-paraphénylène-diamine. Avec une goutte d'une culture commençant à bleuir, il se forme instantanément une magnifique coloration rouge-violacé caractéristique. Le *Bacillus Syncyanus* secrète donc bien une oxydase.

Nous avons ensuite pu constater, au moyen de ce réactif, que 24 heures après l'ensemencement, alors que le bouillon ne présente qu'un développement bactérien médiocre et pas trace de pigment bleu :

1° Une culture qui produit déjà la réaction rouge-violacé caractéristique donnera de la matière colorante ;

2° Une culture qui n'offre à aucun moment cette réaction ne donnera pas de matière colorante ;

3° Lorsque la réaction est instantanée et intense, on peut être assuré d'obtenir un beau pigment abondant et d'un bleu net. Au contraire, si la réaction est progressive et faible, on n'obtiendra qu'une faible quantité de pigment et une vague teinte gris-bleu ou vert sale.

Le phénomène de pigmentation est bien la conséquence directe de la production d'une *Oxydase*.

Nous avons, en effet, vérifié ces faits sur tous les bouillons que nous avons utilisés jusqu'alors. Dans tous les milieux, quelle que soit leur composition, si l'on ne constate pas, le lendemain de l'ensemencement, la coloration rouge-violacé due à l'*Oxydase* avec une solution fraîche de chlorhydrate de tétraméthyl-paraphénylène diamine, on peut être certain de ne pas obtenir de matière colorante.

(1) Ueber die Abhängigkeit der Bildung transitorischer Stärke von der Temperatur und der oxydasischen Wirkung. Grütz. — Wochenschrift für Brauerei, 1899, XVI, p. 549.

Il importe que la solution de ce sel soit toute fraîche, faite au moment de s'en servir, sinon elle se colore déjà sous l'action de l'air et la réaction perd de sa netteté.

Nous avons déjà vu l'action de la chaleur sur la formation de la matière colorante. Tout ce que nous avons observé à son sujet peut s'appliquer à l'*Oxydase*.

C'est-à-dire que depuis la température où le *Bacillus Syncyanus* commence à se développer, jusque vers 27°-28°, il y a production d'*Oxydase*. Cette production passe par un maximum d'intensité entre 18° et 22°, puis diminue et s'annule vers 30°.

De plus, cette *Oxydase* est rapidement détruite par la chaleur. Ainsi prenons une culture de 24 heures, faite à l'étuve à 20°, donnant une belle réaction oxydasique. Portons-la à 30°. En moins d'une heure, cette réaction aura considérablement diminué d'intensité et deviendra presque nulle au bout de quelques heures.

Il suffit de 15 à 20 minutes à 35° pour l'annuler presque complètement.

Et elle ne résiste pas du tout à 40°-45°.

Nous avons essayé l'influence de l'*Oxydase* produite par le *Bacillus Syncyanus* sur différents corps oxydables, entre autres l'hydroquinone. Mais, malheureusement, tous nos essais ont été négatifs.

Action de l'oxydase

Pour étudier de plus près l'action de l'*Oxydase* sur le bouillon synthétique et la formation de la matière colorante bleue, nous avons pris une culture, qui, après 24 heures d'ensemencement, donnait une très belle réaction oxydasique, mais sans trace encore de matière colorante. Nous l'avons filtrée, sous une pression d'air comprimé, sur une bougie « Chamberland » et avons recueilli le filtrat dans un ballon stérilisé. Nous avons constaté qu'un échantillon du liquide filtré donnait encore très nettement la réaction oxydasique

mais d'une façon un peu moins intense qu'avant la filtration.

Nous avons ensuite remis ce bouillon filtré dans l'étuve à 20°. Le lendemain, alors qu'une culture témoin non filtrée commençait à donner une belle coloration bleue, le bouillon d'épreuve n'avait pas changé comme on pouvait le supposer. Nous y avons vérifié la réaction oxydasique et avons constaté qu'elle avait considérablement diminué et n'était plus que très faible. 36 heures après la filtration, elle n'existait plus.

Nous avons, quelques jours après, réensemencé ce bouillon filtré et resté incolore; il est admirablement reparti et a donné une très belle matière colorante bleue.

Il était ensuite intéressant de vérifier l'action de l'*Oxydase* sur une culture ne donnant pas de pigment coloré. Pour cela, nous avons préparé trois bouillons. L'un, selon notre formule, capable de fournir le phénomène de pigmentation; les deux autres à : 3 % glucose *pur*, 0,5 % succinate de Mg et 0,4 % SO_4Am_2 . Ces deux derniers étant dépourvus de $(\text{PO}_4)_2\text{CaH}_4$ ne devaient nous donner ni *Oxydase* ni matière colorante. Nous ensemençons en même temps ces trois ballons. 24 heures après, nous constatons que le bouillon I donne une très belle réaction oxydasique; les deux autres ne présentent à aucun degré ce phénomène.

Nous filtrons le bouillon I comme nous l'avions déjà pratiqué. Après avoir recueilli le filtrat dans les plus grandes conditions d'aseptie et vérifié qu'il donnait encore la réaction oxydasique, mais sensiblement diminuée, nous avons ajouté au bouillon II 25 cm³ de ce bouillon I, et au bouillon III un volume égal au volume de la culture.

Le lendemain, ni II ni III ne présentent de traces de pigmentation, tandis qu'une culture normale témoin commence à se colorer en bleu. De plus, II ne donne pas de réaction oxydasique, mais III produit une coloration rouge-violacé assez nette avec une solution du réactif. Cette réaction est plus franche que celle du bouillon I après filtration.

Le surlendemain, II présente un développement bactérien normal, mais sans production de pigment.

Le bouillon III fournit, au contraire, une petite quantité

de matière colorante gris-bleuté qui augmentera un peu d'intensité, mais sans parvenir jamais à la coloration obtenue dans un bouillon normal.

Nous avons ensuite ajouté le bouillon oxydasique filtré à des cultures de différents âges, 2, 3, 4 et 5 jours.

Les résultats obtenus sont exactement les mêmes que précédemment, avec cette seule différence que plus la culture est vieille plus la formation de matière colorante est faible.

Les expériences précédentes semblent démontrer qu'il ne suffit pas d'ajouter à une culture où se développe bien le *Bacillus Synchronus*, mais sans produire de matière colorante, une certaine quantité de bouillon filtré contenant de l'*Oxydase* pour obtenir la production du pigment bleu. Si cette addition suffisait, il est évident que, vingt-quatre heures après cette opération, on devrait constater l'apparition d'une coloration en même temps que se produit le phénomène de pigmentation dans une culture normale témoin. Or, il n'en est rien.

De plus, nous avons constaté que dans la culture, où nous n'avons ajouté que 25 cm³ de bouillon oxydasique filtré, la réaction oxydasique disparaît rapidement et il ne se produit pas trace de matière colorante.

D'autre part, si à une culture normale, au moment où l'on commence à percevoir une faible teinte bleue, l'on ajoute le bouillon filtré d'une culture donnant une teinte bleue intense, quelle que soit la quantité ajoutée, on ne hâte pas la production du pigment ni augmente son intensité, au contraire, comme le prouve une culture témoin.

C'est donc pas l'addition d'*Oxydase*, ou du moins de ce que la bougie laisse passer de l'*Oxydase*, qui produit, dans l'expérience III, une faible quantité de matière colorante. Et comme la pigmentation, dans ce cas, n'apparaît qu'48 heures après l'addition du bouillon oxydasique, il est permis de croire que le phénomène est dû à une nouvelle génération de bactéries chromogènes, provoquée par l'apport des éléments indispensables au développement de cette fonction.

ACTION DE L'AIR

Le *Bacillus Sincyanus* étant essentiellement aérobie, l'oxygène lui est absolument indispensable pour vivre et se développer.

La production de sa matière colorante exige un renouvellement constant d'air. Il doit donc se produire une certaine consommation d'oxygène.

Il nous a semblé intéressant de rechercher la quantité de ce gaz que peut absorber une culture normale de la bactérie.

Pour cela, nous avons pris un rectificateur d'environ 300 cm³ de capacité et y avons mis 150 cm³ de bouillon. Après stérilisation et ensemencement, nous avons fermé hermétiquement le col. Le tube latéral, qui avait été recourbé, puis rempli de coton pour servir de filtre, fut mis en communication au moyen de caoutchouc à vide, avec un tube barométrique plongeant dans H₂SO₄ de densité, $d = 1,85$.

Nous avons constaté que l'acide sulfurique était monté dans le tube :

A 54 % en 24 heures ;

A 225 % en 48 heures, soit 171 % de plus que la veille ;

A 325 % en 72 heures, soit 100 % de plus que la veille ;

A 270 % en 96 heures, soit 55 % de moins que la veille.

Puis, la colonne barométrique descend progressivement pour retomber à 0 le sixième jour.

Dans nos expériences suivantes, nous avons toujours observé la même allure dans la marche du phénomène.

Malheureusement, dans ces cultures où l'air ne se renouvelle pas, il ne se produit que très peu de matière colorante. Et encore, est-elle grisâtre plutôt que bleue.

C'est pourquoi nous avons été amené à remplacer l'atmosphère ordinaire par de l'air oxygéné pour essayer d'obtenir une meilleure production de pigment bleu.

Après avoir stérilisé, puis ensemencé une culture, nous fermons hermétiquement le col du ballon ; ensuite, par

l'intermédiaire d'un robinet à trois voies, nous attelons ce ballon à une trompe à eau munie d'un tube barométrique et à une cloche contenant de l'oxygène. Nous faisons dans notre ballon un vide partiel et déterminé et laissons ensuite entrer de l'oxygène dans tout l'appareil jusqu'à ce que se soit rétablie exactement la pression atmosphérique du moment. Après avoir mis le ballon à l'étuve, nous adoptons un tube barométrique destiné à mesurer la dépression due à l'absorption d'oxygène. Dans ces conditions, cette absorption est assez grande ; c'est pourquoi nous avons dû remplacer H_2SO_4 dont la densité est un peu faible. De plus, cette densité ne reste pas constante par suite de l'avidité de cet acide pour l'humidité.

Le mercure nous donnant des variations trop petites, nous avons employé le liquide indiqué par M. Thoulet, c'est-à-dire une solution saturée de KI, où l'on dissout HgI_2 . Nous avons ainsi obtenu un liquide de densité 3,096.

Parmi différentes expériences, nous avons obtenu les résultats suivants :

Dans un ballon de 305 cm³ de capacité totale, nous avons mis 100 cm³ de bouillon. Après avoir fait un vide correspondant à une colonne de 300 $\frac{\text{mm}}{\text{m}}\text{m}$ de mercure, nous avons fait rentrer de l'oxygène. Le mélange ainsi obtenu était de :

O_2 105 cm³ à la pression
N 100 cm³ du moment.

La plus forte dépression constatée dans le tube barométrique à liquide mercuriel a été de 485 $\frac{\text{mm}}{\text{m}}\text{m}$, ce qui correspond à une absorption de 30 cm³ d'oxygène à la pression atmosphérique normale.

Dans un ballon de 370 cm³ de capacité totale, nous introduisons 150 cm³ de bouillon. Après addition d'oxygène, l'atmosphère du ballon se trouve formée par un mélange de 105 cm³ d'oxygène et 115 cm³ d'azote. Dans ces conditions, la solution mercurielle, de densité 3,096, s'est élevée de 315 $\frac{\text{mm}}{\text{m}}\text{m}$ dans le tube barométrique, ce qui correspond à la disparition de 21 cm³ d'oxygène.

Dans toutes les expériences de ce genre que nous avons

faites, nous avons constaté que la dépression retombait toujours à 0, entre le cinquième et le sixième jour.

Pour rechercher s'il se formait de l'acide carbonique dans ces cultures, après la disparition de la dépression, nous avons attelé le ballon à une trompe à eau en interposant un barboteur contenant une solution de la $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Immédiatement, nous avons obtenu un notable précipité de CaCO_3 .

Pendant son développement, le *Bacillus Sincyanus* forme donc de l'acide carbonique.

Nous avons essayé de doser les quantités de CO_2 ainsi produit, mais nous n'avons trouvé aucune constance dans ces dosages. Les variations sont relativement grandes et dépendent de la marche de la culture.

INFLUENCE DE L'ACIDITÉ

Nous avons vu que dans toutes les cultures et principalement dans celles où la formation de matière colorante a été le plus intense, il se produisait un accroissement très notable de l'acidité.

Comme le bouillon est loin d'être épuisé en éléments nutritifs, nous avons recherché quelle action avait cette acidité sur le pigment coloré et sur la vie du *Bacillus Sincyanus*.

Nous avons fait trois cultures qui ont été filtrées sur bougie Chamberland à des moments différents :

La première, tout au début de la formation du pigment bleu. L'acidité initiale qui pour 100 cm³ de bouillon était neutralisée à la phénol-phtaléine par 23cm³,4 de NaOH N/20 correspondait à ce moment à 32cm³,6.

Après réensemencement, la culture est repartie et, à l'apparition du bleu, son acidité correspondait à 41cm³, 5 de NaOH. Tandis que les cultures non filtrées donnaient une matière colorante bleu intense, celle-ci produisait un

pigment assez abondant, mais moins coloré et moins net.

Enfin, l'acidité maxima était neutralisée par $48\text{cm}^3,5$ de $\text{NaOH N}/_{20}$.

La seconde a été filtrée au moment du maximum d'intensité du bleu. Son acidité, à ce moment, correspondait à $74\text{cm}^3,5$ de soude titrée. Le bouillon filtré n'était plus bleu ; il présentait un aspect dichroïque rouge et vert. Nous l'avons réensemencé, mais les bactéries y ont végété péniblement sans produire de matière colorante ni d'augmentation d'acidité.

Enfin, *la troisième culture* n'a été filtrée qu'après la précipitation complète de la matière colorante. Son acidité correspondait à ce moment à $80\text{cm}^3,8$ de $\text{NaOH N}/_{20}$ pour 100 cm^3 .

Après réensemencement, les bactéries ne s'y sont non seulement pas développées, mais 8 jours après elles étaient mortes.

Nous avons alors ramené l'acidité de cette culture à l'acidité initiale en la neutralisant avec une solution de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, puis l'avons réensemencée. Les bactéries se sont alors très bien développées et ont produit de la matière colorante. Mais, ce pigment était loin d'avoir l'éclat et l'intensité qu'il avait atteints dans la première culture.

L'acidité, qui correspondait au début à 21 cm^3 de $\text{NaOH N}/_{20}$, était neutralisée au moment de l'apparition du bleu par $28\text{cm}^3,5$ et par $45\text{cm}^3,5$ à la précipitation de la matière colorante.

Nous avons encore répété deux fois cette filtration et neutralisation, mais chaque fois la production de matière colorante était plus faible ; le développement des bactéries était cependant normal.

Nous croyons pouvoir attribuer, en partie du moins, la diminution de la production du pigment à la diminution de la quantité d'acide phosphorique en dissolution, car après avoir ajouté une faible quantité de $(\text{PO}_4)_2\text{CaH}_4$, nous avons obtenu une plus forte production du pigment, mais sa coloration manquait tout à fait de netteté.

Puisque l'augmentation d'acidité arrête le développement des bactéries et, par conséquent, la production de la matière colorante, ne pourrait-on obvier à cet inconvénient en empêchant l'acidité d'augmenter ?

Peut-être pourrions-nous ainsi permettre au *Bacillus Sincyanus* de se reproduire jusqu'à un épuisement plus complet du bouillon.

Nous avons, tout d'abord, mis un peu de CO_3CA ou CO_3Mg dans les cultures dès le début. Dans ces conditions, ces précipités gênent la production du pigment qui est peu abondant et virant sur le violet.

En ajoutant ces sels au moment du maximum d'intensité de la matière colorante, nous n'avons jamais constaté une prolongation de la durée de la coloration bleue ni une nouvelle formation de matière colorante.

Nous avons alors essayé d'abaisser l'acidité de la culture au moment où le bleu était le plus intense, au moyen de différentes bases.

KOH et NaOH nous ont donné de très mauvais résultats, et loin de prolonger la coloration bleue, la faisaient disparaître plus rapidement.

Avec NH_3 et $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en solution, les résultats obtenus ont été moins mauvais. Nous avons eu une sensible prolongation, cependant la matière colorante n'était plus d'un bleu aussi net qu'avant l'addition de ces bases.

Puisque l'acidité, créée dans la culture, arrête le développement du *Bacillus Sincyanus*, nous avons voulu rechercher le degré de résistance de la bactérie aux acides pour la production de son pigment, sa végétation et sa vie.

Nous avons fait cette étude pour trois acides : les acides phosphorique et succinique qui sont indispensables dans nos milieux synthétiques et l'acide lactique qui se forme toujours dans le lait lorsqu'on constate le phénomène du lait bleu (1).

Pour ces expériences, nous avons employé notre milieu ordinaire : glucose 3 %, succinate de Mg 0,5 %, SO_4Am_2 0,4 %

(1) GESSARD. — (Ann. de l'Institut Pasteur, 1891.)

et $(\text{PO}_4)_2\text{CaH}_4$. Mais, nous avons soin de neutraliser exactement le bouillon à la phénol-phtaléine avec une solution de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, avant l'addition des acides étudiés.

Acide succinique. — Cet acide fonctionne d'abord comme excitant. On obtient le maximum de production et d'intensité du pigment avec une dose de 0,17 %. Jusqu'à 0,26 %, il se forme de la matière colorante, mais elle est gris-bleu pâle.

A 0,27 %, la pigmentation est à peu près nulle, les bactéries sont encore normales.

A 0,28 %, il n'y a plus de trace de coloration et les bactéries commencent à souffrir; elles n'ont plus grand mouvement.

A 0,29 %, les bactéries n'ont plus de mouvement. Elles sont plus courtes et plus larges et commencent à former des spores.

A 0,31 %, elles n'ont plus qu'un faible développement. On constate la présence de filaments longs et minces.

Enfin à 0,32 %, elles cessent de se développer, mais ne sont pas tuées.

Elles résistent très bien à une dose de 1,5 %. Laissées pendant dix jours dans ce milieu, nous les avons réensemencées dans un bouillon normal; elles sont admirablement reparties formant leur pigment.

Des doses supérieures les dépriment sérieusement et il faut souvent plusieurs générations pour leur rendre leur vigueur et leur propriété de production de matière colorante.

Au-delà de 3 %, elles sont presque toujours détruites. Une seule fois, nous avons pu les faire reprendre après un court séjour dans ce bouillon. Et encore ne donnaient-elles plus qu'un pigment très faiblement coloré.

Acide phosphorique. — Cet acide donne le meilleur résultat à la dose de 0,15 %.

Les doses supérieures produisent une coloration virant au bleu ardoise, puis au gris foncé et hâtent la précipitation.

À 0,5 %, il n'y a plus formation de pigment. Et la limite de résistance des bactéries à PO_4H_3 ne dépasse pas 4 %.

Acide lactique. — Une dose de 0,27 % donne le maximum (1) d'intensité et de netteté au pigment. Un bouillon contenant 0,42 % produit encore un peu de matière colorante. Avec 0,45 %, il n'y a plus formation de pigment et il commence à se former des spores. Avec 0,5 %, le développement est très faible et on observe des bactéries à l'état de filaments longs et minces. Une dose de 0,6 % arrête la végétation sans toutefois tuer le *Barillus Sincyanus* qui supporte jusqu'à 6 % d'acide lactique.

INFLUENCE DES BASES

Les milieux basiques sont, en général, défavorables à la formation du pigment.

Lorsque la basicité initiale du bouillon de culture est due à NaOH ou KOH, on n'obtient une production de matière colorante qu'à des doses extrêmement faibles. D'ailleurs, ces bases produisent des précipitations dans les bouillons, et en modifient ainsi considérablement la composition.

À la dose très faible de 0,02 %, NH_3 permet encore d'obtenir la formation d'un pigment violacé peu abondant.

Enfin, par addition d'une solution de chaux, jusqu'à la dose de 0,05 % de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, il se forme une matière colorante rouge-violacé, dont la production et l'intensité diminuent lorsqu'on augmente la quantité de $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Cependant, par acclimatation, on arrive à obtenir quelques résultats un peu plus satisfaisants ; mais la coloration est toujours d'une teinte rouge-violacé, due à la réaction du milieu ; elle est très variable et manque, en général, de netteté et d'intensité.

(1) Dans son « Traité de Bactériologie », M. MACÉ indique la dose de 0,2 à 0,3 %.

DÉCOLORATION

D'après les expériences précédentes, nous avons été amené à conclure que la précipitation de la matière colorante et la décoloration du bouillon étaient dues à une peroxydation du pigment. Nous avons déjà vu qu'il nous avait été impossible d'arrêter ou empêcher cette peroxydation en raréfiant ou supprimant l'oxygène dans la culture. On ne fait que retarder légèrement le phénomène.

Nous avons donc recherché s'il n'existait d'autres moyens physiques ou chimiques d'arrêter cette décoloration.

Nous avons essayé d'abord l'action de la chaleur. Les résultats obtenus ont été désastreux, car on ne fait que hâter énormément la précipitation. Une culture portée à l'ébullition est aussitôt complètement décolorée et l'on retrouve la matière colorante, d'un beau bleu quelques instants auparavant, sous forme d'un précipité noir, comme dans une vieille culture.

Les agents chimiques nous ont donné de meilleurs résultats. Nous avons, bien entendu, laissé de côté tous les oxydants ; parmi les antiseptiques, trois sels minéraux nous ont paru avoir une certaine influence : HgCl_2 , KF et surtout SO_4Cu .

Ce dernier sel agit à une dose extrêmement faible. 1 cm d'une solution à 2 ‰ dans 100 cm³ d'une culture retarde la décoloration de 3 à 6 jours, et la matière colorante, au lieu de précipiter en brun foncé, donne un précipité noir-bleuâtre.

Mais encore une fois, nous ne sommes pas parvenu avec les antiseptiques, quelle que fût la dose employée, à arrêter la peroxydation et à conserver au pigment sa coloration et son éclat.

Nous avons également essayé l'action de l'alcool, ajouté à différents moments à des doses croissantes. Nous n'avons eu encore qu'à constater des résultats nuls et souvent même négatifs.

Etat d'une culture décolorée

Au microscope, on ne voit plus que quelques rares bactéries en suspension dans le bouillon. On les trouve précipitées au fond du ballon avec le pigment peroxydé. Elles sont à l'état de spores, offrant presque toutes l'aspect d'une massue. Elles résistent assez longtemps à cet état. Nous avons eu de nombreux exemples de cultures réensemencées après six semaines qui repartaient admirablement et, dans les milieux favorables, produisaient leur matière colorante bleue. Elles résistent d'autant mieux qu'elles ont été laissées à une température moyenne de 10° à 15°.

Une culture dont l'acidité initiale était neutralisée par 34 cm³,5 de NaOH n/20 pour 100 cm³ de bouillon, après avoir donné un beau pigment bleu avait, lorsqu'elle fut décolorée, une acidité correspondant à 63 cm³ de NaOH n/20. Nous avons prélevé deux échantillons de 100 cm³ sur le bouillon après l'avoir convenablement agité pour y remettre tout le précipité en suspension, puis nous les avons distillés, l'un dans le vide d'une trompe à eau à 35°, l'autre à la pression atmosphérique. Le volume recueilli dans les deux opérations était sensiblement le même, environ 60-70 cm³. Ces deux liquides donnaient une réaction très nettement basique qui était due à NH³, comme nous l'avons constaté.

Après avoir ramené le volume des deux bouillons distillés à 100 cm³, nous avons dosé à nouveau leur acidité. Elle n'avait que très légèrement diminué et correspondait à 63,5 cm³ de NaOH n/20 pour la distillation dans le vide, et à 64 cm³ pour la distillation à la pression atmosphérique.

Comme le bouillon qui vient d'être distillé n'était pas basique, le départ d'ammoniaque ne peut s'expliquer que par la dissociation d'un sel de cette base dissous dans la culture. De plus, il faut que l'acide combiné à l'ammoniaque ait un point d'ébullition inférieur ou égal à celui de l'eau, ou que, tout au moins, il soit entraînable par la vapeur d'eau. Sinon, nous devrions constater une augmentation d'acidité dans le bouillon distillé.

Nous avons recherché cet acide dans le liquide condensé sans arriver à le trouver. Il avait donc dû s'échapper à l'état gazeux. Pour vérifier le fait, nous avons distillé dans le vide une certaine quantité de bouillon avec une très faible rentrée d'air. Après le passage dans le réfrigérant, nous faisons barboter l'air dans une solution de H_2SO_4 pour enlever NH_3 , puis dans une solution de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, où nous avons constaté la formation d'un précipité de CaCO_3 .

Nous avons déjà, dans de précédentes expériences, constaté la production de CO_2 . Cet acide forme, dans le milieu de culture, du bicarbonate d'ammoniaque qui se dissocie lorsqu'on distille le bouillon, soit dans le vide, soit à la pression atmosphérique.

Nous avons ensuite recherché, dans les vieilles cultures, s'il y avait formation d'acide organique. Pour cela, nous avons eu recours au procédé habituel : acidifier avec H_2SO_4 et extraire à l'éther les acides mis en liberté. En dehors de l'acide succinique restant, nous n'avons pu constater la présence d'autres acides.

Nous avons également recherché s'il ne s'était pas formé de bases dans les cultures du *Bacillus Sincyanus*. Après avoir rendu le bouillon nettement basique avec NH_3 , nous l'avons agité avec de l'éther.

Après évaporation de l'éther, nous avons obtenu un résidu extrêmement faible, non cristallisé, gras au toucher, très légèrement jaunâtre, ayant une odeur forte et extrêmement désagréable. Nous avons repris ce résidu par l'eau et acidifié par H_2SO_4 . Après avoir ajouté une goutte d'une solution de nitrite de potassium, nous avons obtenu une coloration rosée qui caractérise la présence d'Indol, dont la formation avait déjà été constatée (1).

(1) MACÉ. — Traité pratique de bactériologie, p. 265.

BACTÉRIES DU VOILE

Nous avons recherché s'il n'était pas possible de supprimer au *Bacillus Syncyanus*, dans des bouillons favorables, son pouvoir chromogène sans intervention chimique ni physique.

Pour cela, nous avons fait des cultures successives des bactéries du voile en les réensemencant toutes les trente heures, c'est-à-dire avant qu'elles n'aient encore produit leur pigment bleu.

Nous espérons, dans ces conditions, que le bacille n'ayant plus le temps matériel d'exercer sa fonction oxydasique sur les éléments du milieu, finirait par la perdre, pour ainsi dire par oubli.

Ces recherches ont été poursuivies pendant deux mois en repiquant chaque jour une culture incolore ; mais le *Bacillus Syncyanus* n'a jamais cessé de donner dans les milieux au succinate de Mg, SO_4Am_2 , glucose et $(\text{PO}_4)_2\text{CaH}_4$ la réaction oxydasique et la matière colorante bleue.

Par contre, le bacille s'est si bien acclimaté à ce milieu que, quand nous avons voulu refaire des cultures à l'asparagine ou au lactate d'ammoniaque, cultures qui, au début, nous avaient donné d'assez bons résultats, tant pour le développement de la bactérie que pour la production de son pigment, il a été impossible d'obtenir une formation de matière colorante dans ces milieux.

ÉTUDE DU PIGMENT

L'étude du pigment produit par le *Bacillus Syncyanus* devait être le but principal de notre travail. Mais pas mieux favorisé que les auteurs précédents, il nous a été impossible d'extraire et isoler cette matière colorante. C'est pourquoi nous avons été amené à donner à l'étude de la vie de la bactérie un développement qui a peut-être un peu dépassé les limites dans lesquelles nous aurions désiré rester.

Influence des acides et des bases

Les auteurs qui ont étudié le *Bacillus Syncyanus* ont déjà signalé le virage que font subir au pigment les acides et les bases.

Mais ce virage qui est d'une netteté et d'une précision telles pour la pyocyanine que ce corps pourrait servir de réactif indicateur, est vague et progressif avec la matière colorante produite par le *Bacillus Syncyanus*.

La pyocyanine a ses sels rouge-carmin et la base bleue, tandis que le pigment du « lait bleu » a ses sels colorés en bleu et sa base en rouge.

Sous l'action de NH_3 , une culture bleue du *Bacillus Syncyanus* vire au rouge-violacé. Avec NaOH ou KOH on obtient une teinte rouge brique. Il faut toujours un excès de réactif pour arriver à une teinte à peu près franche. Lorsqu'on neutralise, puis acidifie avec un acide fort, on revient à la coloration bleue, mais cette teinte est bien loin d'être aussi nette et aussi intense que dans la culture primitive.

L'action de la base a évidemment détruit, en partie, la matière colorante ; plus le contact avec la base a été prolongé moins les acides pourront ramener la coloration bleue primitive, et, après une quinzaine d'heures, on n'obtient plus qu'une vague teinte jaune-sale.

Dans les cultures qui n'ont pas une coloration bleue

franche, on peut en augmenter un peu la netteté par addition de faibles doses d'acide. Mais si l'on en met un trop grand excès, la coloration passe au gris-bleu, et, par neutralisation, on ne revient plus à la teinte primitive.

Action de la chaleur

Le pigment est extrêmement sensible à la chaleur. Plus la température est basse, plus il se conserve longtemps.

A 20°, il subsiste environ 48 heures, et à 30°, à peine 24 heures.

Il supporte environ 6 heures la température de 35°, mais au-delà de ce temps, il commence déjà à virer au vert.

Entre 40° et 100° sa décomposition est de plus en plus rapide.

Transportée dans un bain-marie à l'ébullition, une culture bleue est décolorée presque instantanément et la matière colorante forme un précipité noir.

Nous avons pu concentrer des cultures en les distillant à 35° dans le vide d'une trompe à eau. On obtient ainsi un sirop d'un beau bleu-verdâtre qui conserve sa teinte une trentaine d'heures environ.

Des cultures donnant une belle teinte bleue, nous avons essayé d'extraire la matière colorante, soit à l'état de sel, soit à l'état de base, au moyen de toutes sortes de solvants organiques : éther, CHCl_3 , CCl_4 , benzine, éther de pétrole, alcool amylique, CS_2 , etc. Malheureusement, nous n'avons jamais pu obtenir un résultat quelconque.

Nous avons alors essayé de précipiter la matière colorante en saturant le bouillon par différents sels. Nos efforts ne furent pas plus favorisés.

Enfin, nous avons voulu la concentrer par congélation fractionnée. Mais, au lieu de rester dans les eaux-mères, le pigment se trouve englobé dans les cristaux de glace qui se forment en surface.

Par contre, c'était un moyen pour obtenir la matière colorante débarrassée des éléments nutritifs restants auxquels elle est mélangée dans le bouillon. Mais nous n'avons pu ainsi en recueillir que de trop faibles quantités pour pouvoir y doser les éléments.

Le pigment bleu est-il bien en dissolution dans les bouillons de culture ? Nous avons déjà remarqué que lorsque nous filtrions un bouillon bleu sur une bougie Chamberland, le liquide qui passait n'était plus coloré en bleu, mais avait une teinte dichroïque rouge et verte assez peu intense.

Sur la bougie, nous constatons un dépôt gluant, visqueux, d'un bleu très foncé tirant sur le noir.

Nous avons alors essayé de centrifuger un bouillon au moment où le pigment bleu avait son maximum d'intensité. Nous avons bien obtenu sur le fond des tubes un dépôt de bactéries, mais pas trace de matière colorante bleue. D'ailleurs, la teinte du bouillon centrifugé n'avait pas varié, car, comparée à celle du bouillon primitif, elle avait la même intensité.

Avant cette expérience, on aurait pu croire que c'étaient les bactéries qui renfermaient le pigment coloré. Comme la centrifugation précipite les bactéries, mais sans diminuer la coloration du bouillon, c'est donc que le *Bacillus Sincyanus* ne contient pas la matière colorante produite.

Comment se fait-il qu'un corps qui n'est pas en solution dans le bouillon, comme le montre la filtration sur bougie, ne puisse être précipité avec les matières en suspension dans une culture bleue qui est centrifugée ? On est amené, pour expliquer ce phénomène, à supposer que le pigment bleu doit se trouver dans le bouillon à l'état d'émulsion ou peut-être à l'état *Colloïdal*.

Nous avons, d'autre part, remarqué qu'en formant au sein d'une culture bleue un précipité blanc autant que possible et assez volumineux, ce précipité, en se déposant, entraînait avec lui une forte proportion de la matière colorante.

Après filtration et malgré plusieurs lavages, le précipité restait encore assez coloré.

Nous avons particulièrement bien réussi en ajoutant à nos cultures au succinate de Mg, 0,3 % de gélatine, dont la présence, à cette faible dose, ne gêne nullement la production du pigment.

Au moment où le bleu présente son maximum d'intensité, nous versons la culture dans une solution aqueuse de tannin. Immédiatement, il se forme un abondant et volumineux précipité blanc qui englobe la plus grande partie de la matière colorante.

Après plusieurs lavages par décantation, on obtient une masse gélatineuse colorée en bleu assez intense.

Malheureusement, nous n'avons pu réussir à en extraire la matière colorante. A chaque lavage, on en entraîne un peu mécaniquement, surtout si l'eau est légèrement acidulée par HCl; mais on entraîne, en même temps, une certaine quantité de tannin.

La matière colorante, ainsi fixée sur la gélatine, se conserve beaucoup plus longtemps que dans les bouillons. La teinte bleue persiste environ une dizaine de jours, surtout si l'on place le précipité gélatineux à l'abri de l'air, dans un vase rempli d'eau.

Lorsqu'on filtre une culture bleue sur papier ou sur porcelaine par aspiration, la matière colorante forme rapidement un enduit visqueux et imperméable qui se dépose, bouche les pores du filtre et s'oppose bientôt complètement au passage du liquide. Après quelques heures, on décante le liquide restant et on laisse sécher le filtre à basse température. Lorsque la dessiccation est complète, la matière colorante forme sur le filtre un enduit brillant, vernissé, d'un bleu foncé tirant sur le vert. Il adhère très fortement, comme le ferait un vernis à l'alcool et il est impossible de le détacher du filtre sans arracher le papier.

Sur la porcelaine, on peut le gratter avec la pointe d'un couteau; on l'enlève par petits copeaux insolubles dans l'eau, l'alcool, l'éther et les acides étendus.

Nous avons recueilli ainsi l'enduit formé sur les bougies Chamberland, à la suite de filtrations.

Nous l'avons broyé longtemps dans un petit mortier, avec un peu d'eau et du sable de verrier. Puis, après avoir mis le tout en suspension dans l'eau, nous l'avons filtré de nouveau sur bougie. Le liquide qui passait était absolument incolore.

Nous confirmons donc ainsi l'expérience de la centrifugation, en montrant que ce n'étaient pas les bactéries qui, en contenant le pigment, s'opposaient à la filtration de la matière colorante.

Réactions de la matière colorante produite par le « *Bacillus Syncyanus* »

Les bouillons de culture bleus sont extrêmement sensibles aux oxydants : La matière colorante donne plus ou moins rapidement un précipité noir, comme dans les vieilles cultures et il est ensuite impossible, par réduction, de revenir à la couleur primitive.

Les réducteurs, en solution acide, font virer la teinte bleue au gris clair, puis la décolorent complètement. Par addition d'un oxydant doux, l'eau oxygénée étendue, on peut quelquefois ramener une vague teinte bleue qui disparaît rapidement.

En solution basique, les réducteurs détruisent rapidement et complètement le pigment.

Enfin, les cultures bleues du *Bacillus Syncyanus* donnent, avec le réactif de Millon, la coloration rouge caractéristique des albuminoïdes.

Cette matière colorante présente encore quelques réactions communes à ces corps : elle précipite à l'ébullition ; elle forme également un précipité plus ou moins faible avec le sulfate de cuivre, l'acétate de plomb, le bichlorure de mercure, le ferrocyanure de potassium. Par addition d'acide

nitrique, le pigment bleu passe au jaune en chauffant la culture.

La lumière solaire a une certaine influence sur la matière colorante produite par le *Bacillus Sincyanus*.

Dans les cultures faites au jour, l'apparition du pigment s'aperçoit quelques heures plus tôt que dans les milieux laissés à l'obscurité.

Par contre, les bouillons d'un bleu net et intense, exposés aux rayons du soleil, sont décolorés environ deux fois plus rapidement que ceux laissés à l'étuve obscure.

CONCLUSIONS

Le nombre des éléments qui permettent au *Bacillus Syncyanus* de produire son pigment est extrêmement réduit.

De tous les sucres ou corps capables de donner des sucres, le glucose seul est favorable.

Parmi les éléments azotés, l'asparagine donne quelques résultats assez médiocres d'aillensrs.

De tous les sels organiques d'ammoniaque, deux seulement fournissent vraiment de bons résultats : le lactate et surtout le succinate.

L'acide sulfurique est nécessaire, soit sous forme de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, soit de SO_4Mg , et nous n'avons pu lui trouver un succédané.

Si une acidité initiale est nécessaire et même favorise la production du pigment, les limites de variations de cette acidité sont assez restreintes et l'on atteint rapidement une dose qui empêche la formation de la matière colorante.

La sécrétion d'une oxydase par le *Bacillus Syncyanus* est la condition absolument nécessaire à la production de la matière colorante.

Cette oxydase est d'une sensibilité extrême aux variations de température, c'est pourquoi encore la formation du pigment est extrêmement limitée.

Enfin, l'oxygène est non seulement indispensable à la vie de la bactérie, mais encore il est nécessaire à la production de la matière colorante.

Le pigment bleu est, lui aussi, très sensible aux variations de température. Il se conserve d'autant mieux que la température est plus basse.

Il nous a été absolument impossible de l'empêcher de se décolorer. En le mettant à l'abri de l'air, ou grâce à quelques antiseptiques on peut, tout au plus, retarder légèrement cette décoloration.

Nous n'avons pas réussi à l'extraire, ni à l'isoler des bouillons de culture où il n'est, du reste, pas en solution.

La matière colorante doit probablement s'y trouver, soit à l'état d'émulsion, soit de colloïde.

Elle est oxydable et réductible, mais ne se laisse plus ramener ensuite à l'état primitif.

Le pigment bleu est nettement sensible à la lumière solaire.

Enfin, il présente quelques réactions caractéristiques des albuminoïdes.

Vu et approuvé :

Nancy, le 3 mars 1908.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

G. FLOQUET.

Vu et permis d'imprimer :

Nancy, le 6 mars 1908,

Le Recteur de l'Académie de Nancy,

CH. ADAM,

CORRESPONDANT DE L'INSTITUT.

SECONDE THÈSE

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTE

Fabrication industrielle de l'Acide carbonique

Vu et approuvé :

Nancy, le 5 mars 1908.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

G. FLOQUET.

Vu et permis d'imprimer :

Nancy, le 6 mars 1908.

Le Recteur de l'Académie de Nancy,

CH. ADAM.

CORRESPONDANT DE L'INSTITUT.

BIBLIOGRAPHIE

- BOROWSKY. — Pyl's Magazin für gerichtliche Arzneikunde und Med. Polizei. Bd. II, 1788.
- PARMENTIER ET DEYEUX. — *Neueste Untersuchungen und Bemerkungen über verschiedene Arten der Milch*. Aus dem Französischen von Dr Scheerer. Iena, 1800.
- CHABERT ET FROMAGE. — *D'une altération du lait de vache, désignée sous le nom de lait bleu*. Paris, 1805.
- ERMBST. EDT. — *Ueber die blaue und rothe Milch*. Leipzig, 1833.
Separatabdruck aus Erdmann's Journal für Technische und öconomische Chemie. Bd. XVIII.
- C. NADT. — Im Pharmaceutischen Centralblatt, 1833.
- BRACONOT. — Journal de Chimie médicale. II, 2^e série, p. 625, 1836.
- EHRENBERG. — *Die Infusionsthierchen als vollkommen Organismen*, 1838.
- STEINHOF. — *Ueber das Blauwerden der Milch*; Neue Analen der Mecklenburgischen landwirthschaftlichen gesellschaft, 1838. Heft 7, und 8.
- C.-J. FUCHS. — *Beiträge zur näheren kenntniss der gesunden und fehlerhaften Milch der Hausthiere*. Gurlt und Hertwig's Magazin für die gesammte Thierheilkunde. BD. VII, 2, p. 133, 1841.
- HERING. — Repertorium der Thierheilkunde. Jahrgang X, p. 242, 1842.
- WIENER. — Zeitschrift für Thierheilkunde und Viehzucht. Bd. IX. Heft 3, p. 552. Giessen, 1842.
- DROUARD ET LECLERC. — Recueil de Médecine vétérinaire, 1846.
- HAUBNER. — *Wissenschaftliche und praktische Mittheilungen*. Magazin für die gesammte Thierheilkunde. Bd. VXIII, 1852.

- GIELEN. — *Kur der blauen Milch der Kühe*. Magazin für die gesammte Thierheilkunde. Bd. VIII, 2, p. 234, 1864.
- ELTEN. — Centralblatt, für die gesammte Landescultur in Böhmen, Prag, 1864, n° 45.
- HOFFMANN. — Vergl. auch Botanische Zeitung, 1865, n° 13, p. 108, 1865.
- ERDMANN. — *Bildung von Anilinfarben aus Proteinkörpern*. Journal für praktische chemie, Leipzig, 1866, S. 383-407.
- MOSLER. — *Ueber blaue Milch und durch deren genuss herbeigeführte krankheiten*. Virchow's Archiv. Bd. 43, 1868.
- SCHROETER. — *Ueber einige durch Bacterien gebildete Pigmente*. Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen. I, 2, 1875.
- OTTO HELM. — Reichardt's Archiv. d. Pharmacie, 1875, p. 19-24.
- NEELSEN. — *Studien über die blaue Milch*. Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen III, 2, p. 1883.
- REISET. — *Observations sur le lait bleu*. C. R. de l'Acad. des Sciences, XCVI, 1883, p. 682.
- HUPPE. — *Untersuch. über die Zersetzung der Milch durch microorganismen*. Mitth. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, II, 1884, p. 335.
- SCHOLL. — *Contribution à la connaissance des décompositions du lait par les microorganismes: Sur le lait bleu*. Fortschritte der Medicin, 1889, n° 21.
- HEIM. — *Versuche über blau-Milch*. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, V, 1890, p. 518.
- BEHR. — *Ueber eine nicht farbstoffbildende Race des Bacillus der blauen Milch*. Centralblatt f. Bakt. VIII, 1890, p. 485.
- GESSARD. — *Fonctions et races du bacille cyanogène*. Ann. de l'Inst. Pasteur, t. V, 1891, p. 737.
- GESSARD. — *Microbes chromogènes: Pus bleu et lait bleu*. Confé. faite à l'Inst. Pasteur, le 9 avril 1892. Revue scientifique, 1892, n° 19, p. 577.
- Dr K. THUMM. — *Beiträge zur Biologie der fluorescierenden Bakterien*. Separatabdruck aus den Arbeiten des bakteriolog. Instituts der grossh. Hochschule zu Karlsruhe, 1895.

TEISI MATZUSCHITA. — *Der Einfluss der Temperatur und Ernæhrung auf die Eigenbewegung der Bakterien.* Centralblatt, VII, p. 209, 1901.

PAUL ERNST. — *Ueber den Bau der Bakterien. Ergebnisse vitaler Færbung.* Centralblatt, VIII, p. 34, 1902.

MAASSEN ALB. — *Die Zersetzung der Nitrate und der Nitrite durch Bakterien.* (Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. XVIII, 1901. Heft I, p. 21-27. Centralblatt, VIII, 132, 1902.)

E. MACÉ. — *Traité pratique de Bactériologie.*

ERRATA

Page 3, ligne 8 :

Au lieu de Syanogenus, *lire* Cyanogenus

Page 9, ligne 32 :

Au lieu de mobilité, *lire* motilité

Page 14, ligne 21 :

Au lieu de brillants, *lire* brillant

Page 14, dernière ligne :

Au lieu de $\text{COH}_2 - \text{CHNH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CONH}_2$,

lire $\text{CO}_2\text{H} - \text{CHNH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CONH}_2$.

IMPRIMERIE P. PIERRON, RUE DU FOUR, 1, NANCY
